

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA APLICADAS

Pneumonia associada a ventilação mecânica por amostras de *Pseudomonas aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos: fatores de risco, prognóstico clínico e caracterização epidemiológica e molecular em uma Unidade de Terapia Intensiva de Adultos

Ana Luiza de Souza Faria

Uberlândia – MG

Junho - 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA APLICADAS

Pneumonia associada a ventilação mecânica por amostras de *Pseudomonas aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos: fatores de risco, prognóstico clínico e caracterização epidemiológica e molecular em uma Unidade de Terapia Intensiva de Adultos

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

Orientador:

Prof. Dr. Paulo P. Gontijo Filho

Co-orientadora:

Profa. Dra. Marise D. Asensi

Ana Luiza de Souza Faria

Uberlândia – MG

Junho - 2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

- F224p Faria, Ana Luiza de Souza, 1989-  
2014      Pneumonia associada a ventilação mecânica por amostras de *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos; fatores de risco, prognóstico clínico e caracterização epidemiológica e molecular em uma Unidade de Terapia Intensiva de adultos / Ana Luiza de Souza Faria. – 2014.  
55 p. : il.
- Orientador: Paulo P. Gontijo Filho.  
Coorientadora: Marise D. Asensi.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.  
Inclui bibliografia.
1. Imunologia - Teses. 2. *Pseudomonas aeruginosa* - Teses. 3. Pneumonia - Teses. 4. Unidade de tratamento intensivo – Teses. 5. Bactérias patogênicas – 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: 612.017



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



Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Ana Luiza de Souza Faria

“O impacto da resistência aos carbapenêmicos na pneumonia associada a ventilação mecânica por *Pseudomonas aeruginosa*: fatores de risco, impacto clínico, caracterização epidemiológica e molecular em isolados de uma unidade de terapia intensiva de adultos”

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, 16 de junho de 2014.

Prof. Dr. Plínio Trabasso – UNICAMP

Profa. Dra. Lizandra Ferreira de Almeida e Borges – ICBIM/UFU

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

[www.imunoparasito.ufu.br](http://www.imunoparasito.ufu.br) - E-mail: [coipa@ufu.br](mailto:coipa@ufu.br) - Telefax: (034) 3218-2333  
Av. Amazonas, s/n - Bloco 4C, Sala 4C218 - Campus Umuarama  
Uberlândia, MG, Brasil - CEP: 38.405-320

*Dedico esta dissertação primeiramente a **Deus**, a minha mãe, meus tios, tias e primo, pelo apoio. Esta conquista também é de vocês!*



*“O que prevemos raramente ocorre;  
o que menos esperamos geralmente acontece. ”*

**[Benjamin Disraeli]**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, pelas oportunidades e por todas as conquistas.

A minha mãe Maria Luiza, que sempre foi mãe e pai, que dedicou a mim tanto amor, sempre auxiliou, e estava ao meu lado nos piores e melhores momentos, sei que sem o seu apoio nada disso seria possível, obrigada por se orgulhar tanto de mim.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo, por todo apoio, dedicação, paciência e principalmente por confiar em mim.

AProf<sup>a</sup>. Dra. Rosineide, obrigada por todo subsídio e disponibilidade.

A Dra. Marise Dutra Asensi, e todos os alunos e técnicos do LAPIH – IOC/Fiocruz, RJ, pela atenção, oportunidade e treinamento.

Ao Tio José Eustáquio e a Madrinha Marleide por todos os anos de ensino, graças a vocês adquiri grande parte do meu conhecimento.

Ao meu Padrinho Kiko, que foi um pai pra mim, sempre me apoiou, e nos momentos mais difíceis esteve comigo. Muito Obrigada!

Ao meu avô José (*in memorian*), que infelizmente não está mais entre nós. Tive nele o exemplo de pessoa correta e digna. Muito obrigada por toda a ajuda, sei que de onde estiver estará sempre olhando por mim e orgulhoso por concluir mais esta etapa.

Madrinha Dezirrê, Vó Maria e ao meu primo João Victor por todo amor, auxílio, disponibilidade e companheirismo.

A minha madrinha Maria Inez, e meus primos Thiago e Raphael por terem me acolhido em Uberlândia sempre que necessitei.

Aos meus amigos: Daiane, Loiane, Priscila, Milena, Juliane, Melina pela am  
cumplicidade.

A todos os meus amigos e companheiros do Laboratório de Microbiologia, Sabrina, Paola, Raquel, Juliana, Deivid, Nayara, Iara, Ana Paula, Bruna, Lizandra e tantos outros, pela convivência, carinho e também pelas “chacrinhas”.

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

Aos professores que aceitaram o convite para participar da minha banca de qualificação, Profa. Dra. Renata, Prof. Dr. Sidney e Prof. Dr. Orlando, pelo apoio, colaboração e sugestões propostas.

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 Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.

A todos os funcionários UTI Adulto (4º andar) do Hospital de Base do Distrito Federal (HDBF).

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

A CAPES, pela bolsa de estudos.

**Muito Obrigada!**



## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS .....	11
LISTA DE FIGURAS .....	14
LISTA DE TABELAS .....	15
RESUMO .....	16
ABSTRACT .....	17
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	21
2.1. Objetivo Geral .....	21
2.2. Objetivos Específicos .....	21
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	22
3.1. Hospital/Unidade .....	22
3.2. Desenho do estudo .....	22
3.3. Definições .....	23
3.4. Técnicas Microbiológicas .....	25
3.4.1. Coleta de aspirado traqueal .....	25
3.4.2. Coleta de sangue e hemoculturas .....	26
3.4.3. Estocagem .....	26
3.4.4. Testes de susceptibilidade “ <i>in vitro</i> ” aos antimicrobianos .....	26
3.4.5. Técnicas Fenotípicas .....	26
3.4.5.1. Fenótipo MBL .....	27
3.5. Técnicas Moleculares .....	27
3.5.1. Extração de DNA .....	27
3.5.2. Detecção dos genes codificadores de MBL pela técnica de Multiplex PCR .....	27
3.5.3. Tipagem molecular pelo PFGE ( <i>Pulsed Field Gel Eletrophoresis</i> ) .....	29

## SUMÁRIO (continuação)

3.5.4. Digestão com endonucleases de restrição .....	29
3.5.5. Eletroforese em campo pulsado (PFGE) .....	30
3.6. Análise pelo Comitê de Ética .....	30
3.7. Análise Estatística.....	30
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>41</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>45</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>46</b>
Anexo I .....	56
Anexo II.....	57
Anexo III .....	58

**LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS**

<b>&lt;</b>	Menor
<b>&gt;</b>	Maior
<b>≤</b>	Menor ou igual
<b>≥</b>	Maior ou igual
<b>μg</b>	Microgramas
<b>μL</b>	Microlitros
<b>AMI</b>	Amicacina
<b>APS</b>	Ampicilina/sulbactam
<b>BHI</b>	<i>Brain Heart Infusion</i>
<b>CLSI</b>	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
<b>COL</b>	Colistina
<b>CPIS</b>	<i>Clinical Pulmonary Infection Score</i>
<b>dNTP</b>	Desoxinucleotídeos
<b>DP</b>	Desvio Padrão
<b>EDTA</b>	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
<b>et al.</b>	E colaboradores
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>FiO<sub>2</sub></b>	Fração Inspirada de Oxigênio
<b>GEN</b>	Gentamicina
<b>HC-UFU</b>	Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia
<b>IC</b>	Intervalo de confiança

<b>IOC/Fiocruz</b>	Instituto Oswaldo Cruz / Fiocruz
<b>ICBIM</b>	Instituto de Ciências Biomédicas
<b>IMI</b>	Imipenem
<b>IMP</b>	Imipenemase
<b>LAS</b>	Limite de Alerta Superior
<b>LCS</b>	Limite de Controle Superior
<b>MβL</b>	Metalo-β-lactamase
<b>mg</b>	Miligrama
<b>MIC</b>	<i>Minimum Inhibitory Concentration</i> , Concentração Inibitória Mínima
<b>mL</b>	Mililitro
<b>MDR</b>	Multirresistente
<b>OR</b>	<i>Odds Ratio</i> – Razão de possibilidades
<b>OXA</b>	Oxacilinase
<b>PaO<sub>2</sub></b>	Pressão parcial de oxigênio
<b>PARC</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente aos carbapenêmicos
<b>PAV</b>	Pneumonia associada à ventilação mecânica
<b>pb</b>	<i>base pair</i> , par de base
<b>PB</b>	Polimixina B
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Reação em Cadeia da Polimerase
<b>PFGE</b>	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> , Eletroforese em Campo Pulsado
<b>PM</b>	Padrão de peso molecular
<b>RR</b>	Risco Relativo

<b>SENTRY</b>	<i>Antimicrobial Surveillance Program</i>
<b>THM</b>	Teste de Hodge Modificado
<b>TIG</b>	Tigeciclina
<b>TSA</b>	<i>Trypticase Soy Agar</i>
<b>TSB</b>	<i>Trypticase Soy Broth</i>
<b>UFC/mL</b>	Unidade Formadora de Colônia / mililitro
<b>UFU</b>	Universidade Federal de Uberlândia
<b>UTI</b>	Unidade de Terapia Intensiva
<b>VIM</b>	Verona Imipenemase
<b>VM</b>	Ventilação Mecânica
<b>vs.</b>	<i>Versus</i>
<b>β</b>	Beta
<b>χ<sup>2</sup></b>	Qui-quadrado

## LISTA DE FIGURAS

<b>Quadro 1:</b> Parâmetros e pontos atribuídos para o cálculo do CPIS.....	<b>22</b>
<b>Quadro 2:</b> Cálculo do Índice de Co-morbidade de Charlson, segundo as co-morbidades.....	<b>23</b>
<b>Quadro 3:</b> <i>Primers</i> específicos para detecção dos genes codificadores de carbapenemases.....	<b>26</b>
<b>Quadro 4:</b> Condições para amplificação nas reações de detecção dos genes codificadores de carbapenemases por PCR.....	<b>27</b>
<b>Figura 1:</b> Curva endêmica de Pneumonia associada a Ventilação Mecânica por 1000 pacientes dia, de outubro de 2011 a novembro de 2012.....	<b>34</b>
<b>Figura 2:</b> Perfil de resistência aos antimicrobianos de amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas na UTI-A do HC-UFU.....	<b>34</b>
<b>Figura 3:</b> Dendograma resultante da análise em eletroforese em campo pulsado (PFGE), perfil de amostras isoladas de pacientes na UTI-A do HC-UFU.....	<b>37</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> As características dos pacientes e fatores de risco de PAV causada por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em UTI-A do HC-UFU.....	<b>30</b>
<b>Tabela 2:</b> Incidência de Pneumonia associada a ventilação mecânica (PAV) em pacientes internados na UTI de adultos.....	<b>33</b>
<b>Tabela 3:</b> Multirresistência de <i>P. aeruginosa</i> recuperada de pacientes com pneumonia associada a ventilação mecânica precoce e tardia na UTI-A do HC-UFU no período de março de 2011 a novembro de 2012.....	<b>35</b>
<b>Tabela 4:</b> Caracterização em isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , como teste de MBL, antibiótipo, perfil de resistência.....	<b>36</b>
<b>Tabela 5:</b> Genótipos e perfis de resistência de isolados de sangue e aspirado traqueal de amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em uma UTI-A.....	<b>38</b>

## RESUMO

A prevalência de *Pseudomonas aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos como agente etiológico de infecções hospitalares em unidades críticas de adultos aumentou na última década, principalmente em países em desenvolvimento. O objetivo deste estudo foi identificar características epidemiológicas e moleculares relacionadas com Pneumonia Associada a Ventilação Mecânica (PAV) por amostras resistentes vs susceptíveis a carbapenêmicos em pacientes internados em uma unidade de terapia intensiva, Hospital de Clínicas, Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, no período de março de 2011 a novembro de 2012. As amostras resistentes foram avaliadas fenotípica e genotipicamente quanto ao mecanismo de resistência através da inativação enzimática por metalo-beta-lactamases, bem como quanto ao perfil clonal pela técnica de eletroforese em campo pulsátil (PFGE). No total, sessenta episódios/pacientes foram incluídos, sendo a maioria resistente aos carbapenêmicos (53,4%). Cinco (15,6%) pacientes apresentaram simultaneamente episódios de bacteremia por *P. aeruginosa*. PAVs por amostras resistentes aos carbapenêmicos foram relacionadas com maior gravidade do paciente (grupo com idade maior que 60 anos, escores “*Clinical Pulmonary Infection Score*”-CPIS e Charlson, e prescrição de antibióticos de largo espectro), mas quando da análise pela técnica de regressão logística múltipla nenhuma destas características mostrou-se como fator independente associado aos pacientes com PAVs por amostras resistentes. O teste fenotípico foi positivo para 13 (44,8%) amostras indicando a presença de metalo-beta-lactamase, ao contrário do observado para o genotípico, evidenciando uma especificidade baixa, enquanto uma (3,4%) amostra foi positiva apenas no teste genotípico (*bla<sub>IMP</sub>*). Vinte e dois isolados foram submetidos a discriminação clonal pelo teste de PFGE evidenciando um perfil policlonal, com a predominância de três clones (A, C e H). Os nossos resultados evidenciam a importância de infecções hospitalares graves na unidade crítica de adultos do hospital com um predomínio de *P. aeruginosa* como principal agente etiológico bem como de amostras resistentes aos carbapenêmicos. As infecções foram predominantemente tardias e em pacientes graves, evidenciando um pior prognóstico do que aquelas causadas por amostras susceptíveis, segundo dados de análise estatística univariada. Eles também sugerem que a presença de outros mecanismos de resistência tais como perda de porina e a superexpressão de bomba de efluxo.



## ABSTRACT

The prevalence of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* has increased over the past decade mainly in developing countries hospitals. The purpose of this study was to identify epidemiological and molecular characteristics of Ventilator Associated Pneumonia (VAP) due to carbapenem-resistant vs carbapenem susceptible *Pseudomonas aeruginosa* isolates from one intensive care unit, Hospital de Clínicas, Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais from March 2011 to November 2012. The carbapenem resistant was evaluated genotypically and phenotypically, as well as an analysis of the clonal isolates (PFGE). In total sixty VAP episodes/patients were included, most resistant to carbapenems 32 (53.4%). Five (15.6%) episodes concomitantly presented *P. aeruginosa* bacteremia, in which the origin was the respiratory tract. Resistant *P. aeruginosa* VAPs were more likely related with the severity patients than the susceptible strains (age, CPIS, Charlson and more antibiotic prescript), but when analyzed by multiple logistic regression none showed these characteristics as independent factor associated with patients with PAVs by resistant strains. The phenotypic test was positive for 13 (44.8%) samples indicating the presence of metallo-beta-lactamase, unlike what was observed with genotype, showing a low specificity, while one (3.4%) sample was positive only on the genotypic test (*bla<sub>IMP</sub>*). Twenty-two isolates were subjected to clonal discrimination by PFGE test showing a polyclonal profile, with predominance of three clones (A, C, H). Our results highlight the importance of serious nosocomial infections in adult critical unit of the hospital with a predominance of *P. aeruginosa* as etiological agent of carbapenem resistant strains. Infections were predominantly late and in severe patients, showing a worse prognosis than those caused by susceptible samples, according to univariate statistical analysis. They also suggest that the presence of other mechanisms of resistance such as loss of porin and overexpression of the efflux pump.

## 1. INTRODUÇÃO

*Pseudomonas aeruginosa* é um importante patógeno oportunista associado com infecções hospitalares graves (FEHLBERG et al., 2012), sendo o principal agente de pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) (PEÑA et al., 2013). Nos hospitais brasileiros, amostras multirresistentes deste micro-organismo destacam-se como importante causa de infecções hospitalares, em especial nos casos de pneumonia (ROSSI, 2011).

A PAV é definida quando do uso de ventilação mecânica por tempo  $\geq 48$  horas (DAVIS, 2006), sendo a principal via de aquisição da infecção a micro aspiração de organismos presentes na orofaringe, que poderá estar previamente colonizada por micro-organismos potencialmente patogênicos, como bacilos Gram negativos e *Staphylococcus aureus*, ou mesmo por meio de refluxo do estômago para a orofaringe. Outras rotas potenciais são o transporte hematogênico de micro-organismos para o pulmão, a partir de infecções locais, como por exemplo, as infecções de corrente sanguínea relacionadas ao uso de cateter, ou advindas do meio ambiente, especialmente por meio das mãos de profissionais de saúde ou equipamento respiratório contaminado (broncoscópios), aerossóis, água ou ar contaminado (ALP; VOSS, 2006; BONTEN, 2011; GOLIA; SANGEETHA; VASUDHA, 2013).

A definição de PAV é baseada em critérios clínicos, incluindo sinais e sintomas como: febre, hipotermia, secreção purulenta, achados radiológicos, como infiltrado novo ou progressivo, laboratoriais, com presença de leucocitose ou leucopenia e microbiológicos (VALENCIA; TORRES, 2009; DWIVEDI et al., 2010; NIEDERMAN, 2010). Os critérios clínicos e radiológicos são inespecíficos, já que podem estar associados a outras doenças pulmonares comuns em pacientes internados em Unidades de Terapia intensiva (UTI) tais como: síndrome da angústia respiratória (SARA), embolia e infarto pulmonar entre outras (DIAZ et al., 2009; KIENINGER; LIPSETT, 2009). A utilização de critério microbiológico no diagnóstico é recomendada pela sua maior especificidade, além de permitir o isolamento do agente etiológico e definição do seu perfil de susceptibilidade aos antibióticos e uma terapia antibiótica adequada, consequentemente, com um melhor prognóstico para o paciente (BONTEN, 2011).

As PAVs estão relacionadas com hospitalizações mais prolongadas e altas taxas de mortalidade e custos de tratamento (HAN; LIU, 2010). Enquanto a taxa de incidência de

PAV nos EUA é de 5,5/1000 dias de ventilação em UTIs de adultos, em UTIs mistas de países latino-americanos ela é mais alta, podendo variar entre 10 a 52/1000 dias de ventilação (ROSENTHAL et al., 2006).

Os fatores de risco relacionados ao desenvolvimento de PAVs por *P. aeruginosa* incluem idade avançada, gravidade da doença, presença de co-morbidades, sobretudo doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), além de cardiopatias, cirurgias, procedimentos invasivos e o uso de corticoides e antibióticos. O simples uso de ventilação mecânica somada a sua duração são considerados os fatores mais importantes nesta síndrome infecciosa (ALP; VOSS, 2006; NIEDERMAN, 2010; SHI et al., 2010). Entretanto, estudos considerando fatores predisponentes exclusivamente para PAVs por amostras de *P. aeruginosa* multirresistentes ou resistentes aos carbapenêmicos são escassos (ZAVASCKI et al., 2006), e sugerem que a duração da ventilação mecânica, internação prolongada e o uso prévio de antibióticos podem facilitar este tipo de pneumonia (VOORINTHOLT et al., 2014).

E o fato que a resistência de bactérias aos antimicrobianos representa um problema de saúde pública mundial (RICE; SAMH; BONOMO, 2003), e o Programa de Vigilância Antimicrobiana – SENTRY (“*Antimicrobial Surveillance Program*”) mostrou que amostras de *P. aeruginosa* provenientes de hospitais brasileiros, recuperadas entre 2008-2010, apresentaram uma reduzida susceptibilidade a ceftazidima (61,1%), fluoroquinolonas (56,7%) e imipenem (57,6%) (GALES et al., 2012). A resistência deste micro-organismo está relacionada à aquisição de genes, bem como mutações, que conferem mecanismos de inativação enzimática aos  $\beta$ -lactâmicos, como à ceftazidima, cefepime e carbapenêmicos, além dos aminoglicosídeos, modificação no sítio alvo, como para as fluoroquinolonas, diminuição da permeabilidade do envoltório da bactéria com a perda de porina e eliminação do antibiótico pela maior expressão de bombas de efluxo (LISTER; WOLTER; HANSON, 2009; XAVIER et al., 2010).

Na última década, os carbapenêmicos e a associação de  $\beta$ -lactâmicos com inativadores de  $\beta$ -lactamases representaram as principais opções no tratamento de infecções graves por *P. aeruginosa*. Infelizmente a utilização destes antibióticos, principalmente os carbapenêmicos, resultou na emergência de amostras não só resistentes a esta classe de  $\beta$ -lactâmicos, mas multirresistentes, não respondendo também ao tratamento com aminoglicosídeos e fluoroquinolonas (GALES et al., 2003; QUALE et al., 2006).

A resistência de *P. aeruginosa* aos carbapenêmicos ocorre principalmente pela

produção de enzimas como as metalo- $\beta$ -lactamases (MBLs), e outras como, a KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) e OXA-carbapenemase (GALES et al., 2003; QUALE et al., 2006; CEZARIO et al., 2009; SCHEFFER et al., 2010). Estes mecanismos podem ser expressos isoladamente ou combinados e desempenham um papel importante na resistência múltipla aos antimicrobianos aumentando a probabilidade de utilização de uma terapia antimicrobiana inapropriada (JACOBY; MUNHOZ-PRICE, 2005), o que resulta em um pior prognóstico de evolução clínica e aumento na mortalidade (ZAVASCKI et al., 2006).

Nos últimos anos a produção de MBL por *P. aeruginosa* assumiu grande importância epidemiológica, com as amostras associadas a altas taxas de mortalidade (SAMUELSEN et al., 2010). A expressão dessas enzimas está associada a elementos genéticos móveis incluindo integrons, transposons e plasmídeos (WALSH et al., 2005). Atualmente, são conhecidas nove subclasses dessas enzimas: IMP (*Imipenemase*), VIM (*Verona Imipenemase*), SPM-1 (*São Paulo MBL*); GIM (“*German Imipenemase*”) e SIM-1 (“*Seul Imipenemase*”) (MENDES et al., 2006), e mais recentemente AIM-1 (*Australian Imipenemase*) (YONG et al., 2007), KHM (“*Kyorin University Hospital*”) (SESIGUCHI et al., 2008), NDM-1 (“*New Delhi MBL*”) (YONG et al., 2009) e DIM-1 (“*Dutch imipenemase*”) (POIREL et al., 2009).

No Brasil, as subclasses mais prevalentes são: IMP-1 e SPM-1 (MENDES et al., 2006), esta última relatada pela primeira vez em amostra recuperada de urina, na cidade de São Paulo (TOLEMAN et al., 2002), porém já descrita em várias outras regiões do país, incluindo os estados do Paraná, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Pernambuco, Maranhão e Minas Gerais (GALES et al., 2003; CIPRIANO et al., 2007; GASPARETO et al., 2007). Em outros países na América do Sul como Argentina, Venezuela, Chile e Colômbia a presença de VIM-2, VIM-8 e VIM-11 já foi relatada em amostras de *P. aeruginosa* (QUEENAN; BUSH, 2007).

A disseminação destes genes responsáveis pela resistência aos antibióticos, bem como a existência de vetores que facilitam sua transmissão e/ou integração no genoma/plasmídeo no ambiente hospitalar é potencializada pela existência de determinados clones mais capacitados a abrigar estes genes exógenos. Investigações de epidemiologia molecular são recomendadas para a determinação destes clones, sendo que a técnica de “*Pulsed-field gel electrophoresis*” (PFGE) permanece como escolha, por ser considerada o “padrão-ouro” para caracterização de amostras de *P. aeruginosa* (PELEG;

SEIFERT; PATERSON, 2008; HAMOUDA et al., 2010).

A situação ecológica, pela maior prevalência destes clones é facilitada em condições onde há um emprego excessivo de antibióticos potentes e de largo espectro, como é o caso dos carbapenêmicos, que funcionam como pressão na seleção de amostras resistentes, assim como deficiência nas práticas de prevenção e controle de infecções hospitalares, a não adesão à adequada prática de higiene das mãos, com água e sabão ou gel alcoólico e descontaminação do ambiente, muitas vezes por falta de recursos humanos qualitativa e quantitativamente e financeiros como em países em desenvolvimento como o Brasil (HSUEH; CHEN; LUH, 2005).

Levando em consideração a importância das PAVs em relação a morbimortalidade, os custos de internação em hospitais de grande porte por todo o mundo, além da pouca disponibilidade de informações microbiológicas, sobretudo, epidemiológicas no país, há necessidade de implementação de políticas de controle das infecções adquiridas no hospital, do consumo de antibióticos, a rápida disseminação mundial dos genes de resistência e seu impacto negativo na terapêutica empírica relacionada, sendo necessário um melhor esclarecimento da epidemiologia das infecções por micro-organismos resistentes aos antimicrobianos, justificam a investigação realizada.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Avaliar os aspectos epidemiológicos clássicos e moleculares das PAVS, com e sem bacteremia secundária por *P. aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos, em uma Unidade de Terapia Intensiva de Adultos.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar os indicadores epidemiológicos de PAVs por 1000 dias de Ventilação Mecânica e densidade de uso da prótese ventilatória;
- Avaliar a distribuições endêmica e epidêmica dos casos;
- Avaliar fenotipicamente a produção de carbapenemase e confirmar e relacionar aos

principais genótipos por técnicas moleculares;

- Avaliar a presença dos principais fenótipos relacionados à produção de carbapenemases;
- Avaliar a natureza clonal ou policlonal das amostras de *P. aeruginosa* resistentes as carbapenemases.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. HOSPITAL/UNIDADE**

O Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU) é um hospital de ensino, com 530 leitos, que oferece atendimento de nível terciário e apresenta uma Unidade de Terapia Intensiva de Adultos (UTI-A) mista, com um total de 30 leitos.

#### **3.2. DESENHO DO ESTUDO**

Foi realizado um estudo de coorte prospectivo incluindo os pacientes com PAV por *P. aeruginosa*, com ou sem bacteremia, susceptível/resistente ao imipenem, internados na UTI-A, no período de março de 2011 a novembro de 2012. Foram considerados apenas o primeiro episódio de PAV por *P. aeruginosa* por paciente, detectado por meio de vigilância diária, busca ativa na unidade. As características demográficas, clínicas e epidemiológicas foram obtidas em prontuários médicos e uma ficha individual foi preenchida para cada paciente (ANEXO I).

As amostras clínicas de *P. aeruginosa* (aspirado traqueal e sangue) foram recuperadas junto ao laboratório de microbiologia do hospital, recultivadas e estocadas a fim de posterior avaliação microbiológica e molecular.

### 3.3. DEFINIÇÕES

**PAV:** infecção que se manifesta após 48 horas de intubação nos pacientes ventilados mecanicamente (CHASTRE, 2005), com critérios clínicos (aparecimento ou modificação de secreção respiratória, hipertermia ou hipotermia), radiológico (aparecimento ou modificação de imagem radiológica com infiltrado), laboratorial (leucocitose), e microbiológico (contagem no aspirado  $\geq 10^6$  UFC/mL), segundo definições do “*Centers for Diseases Control and Prevention*” – CDC (NIEDERMAN, 2005; FURTADO et al., 2007).

**Bacteremia:** presença de bactérias na corrente sanguínea comprovada laboratorialmente;

**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).

**Multirresistência:** resistência a três ou mais classes dos seguintes agentes antimicrobianos: piperacilina, ceftazidima, fluoroquinolonas, carbapenêmicos (imipenem, meropenem e doripenem) e aminoglicosídeos.

**Mortalidade hospitalar:** número de óbitos com bacteremia em até 30 dias, após o diagnóstico microbiológico de infecção.

Os seguintes indicadores epidemiológicos foram calculados para todas as PAVs, independente da etiologia, e definidos como:

**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 paciente/dias.

#### ***Clinical Pulmonary Infection Score – CPIS***

O índice CPIS (“*Clinical Pulmonary Infection Score*”) foi utilizado e calculado, por ser uma ferramenta que auxilia no diagnóstico de PAV, utilizando como base os pontos atribuídos aos sinais e sintomas de pneumonia, como descrito no quadro abaixo (ZILBERBERG; SHORR, 2010).

**Quadro 1:** Parâmetros e pontos atribuídos para o cálculo do CPIS.

Parâmetros	Pontos
Temperatura, °C	
36,5 - 38,4	0
38,5 - 38,9	1
$\geq 39,0$ e $\leq 36,0$	2
Nível de Leucócitos no sangue, Leucócitos/mm <sup>-3</sup>	
4,000 - 11,000	0
<4,000 ou >11,000	1
+ bastões $\geq 500$	2
Secreção Traqueal	
< 14 +	0
$\geq 14$ +	1
Purulência maior	2
Oxigenação, PaO <sub>2</sub> : FiO <sub>2</sub> , mmHg	
> 240 ou ARDS	0
$\leq 240$ e sem ARDS	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 $\leq 1$ ou nenhum crescimento	0
Cultura das bactérias patogênicas > 1 +	1
Cultura das mesmas bactérias patogênicas > 1+	2

ARDS: síndrome da angústia respiratória aguda; PaO<sub>2</sub>: FiO<sub>2</sub>: relação da pressão parcial de oxigênio arterial para a fração de oxigênio inspirado.

### Índice de Co-morbidade de Charlson

O Índice de Co-morbidade de Charlson (ICC) é uma ferramenta utilizada para avaliar os efeitos da co-morbidades do paciente sobre o prognóstico, sendo calculado com base em uma pontuação que varia de 1, 2, 3 e 6, conforme o quadro abaixo (WANG et al., 2007; MARTINS; BLAIS; MIRANDA, 2008; ÇILDIR et al., 2013).



**Quadro 2:** Cálculo do Índice de Co-morbidade de Charlson, segundo as co-morbidades.

Pontuação	Co-morbidade
1	Infarto Agudo do Miocárdio Insuficiência Cardíaca Congestiva Doença Vascular Periférica AVC Isquêmico (sem sequelas) Dementia DPOC Doença do tecido conjuntivo Úlcera gastrointestinal Doença hepática “ligeira” Diabetes Mellitus
2	AVC Hemorrágico (com sequela) Doença Renal Moderada ou Grave Diabetes com danos de órgãos Qualquer Tumor Leucemia Linfoma
3	Doença hepática moderada ou grave
6	HIV Tumor Metastático sólido

AVC: Acidente vascular cerebral; DPOC: Doença pulmonar obstrutiva crônica; HIV: Vírus da imunodeficiência humana

### 3.4. Técnicas Microbiológicas

#### 3.4.1. Coleta de aspirado traqueal

O aspirado endotraqueal foi coletado de pacientes em uso de prótese ventilatória, com suspeita de pneumonia durante a higienização da árvore ventilatória, por meio de sonda nº 12 no início da manhã, por fisioterapeutas ou enfermeiros da unidade avaliada, em tubo de ensaio estéril e encaminhado ao setor de Microbiologia do laboratório de Análises Clínicas do HC-UFU, para análise quantitativa, utilizando o limite de  $\geq$

10<sup>6</sup>UFC/ml

### **3.4.2. Coleta de sangue e hemoculturas**

O sangue foi coletado por punção periférica e a cultura realizada no Laboratório de Microbiologia do HC-UFU utilizando o sistema automatizado *BacT/ALERT*® (BioMérieux). A identificação das culturas positivas e os testes de suscetibilidade aos antimicrobianos foram realizados por automação utilizando o sistema Vitek®2 (BioMérieux), também no laboratório do hospital.

### **3.4.3. Estocagem**

As amostras de *P. aeruginosa* provenientes de aspirado traqueal e sangue, isoladas e identificadas no Laboratório de Microbiologia do HC-UFU, foram encaminhadas para o Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM), e recultivadas em TSA pela técnica de esgotamento para obtenção de cultura pura e, posteriormente, subcultivadas em tubos criogênicos contendo 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 et al., 2001).

### **3.4.4. Testes de susceptibilidade “*in vitro*” aos antimicrobianos**

A susceptibilidade das amostras de aspirado traqueal e sangue foram determinadas por meio do sistema automatizado 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 micro-organismo.

### **3.4.5. Técnicas Fenotípicas**

#### **3.4.5.1. Fenótipo MBL (ARAKAWA et al., 2000; LEE et al., 2001, com modificações)**

As amostras bacterianas que apresentaram resistência a ceftazidima e/ou imipenem foram submetidas ao teste de sinergismo com duplo disco. Uma suspensão bacteriana com turvação equivalente a escala 0,5 de McFarland foi preparada em TSB e, em seguida, uma alíquota foi semeada em placa de petri contendo ágar Mueller-Hinton de forma a obter um crescimento confluyente. Foram adicionados sobre o ágar discos de ceftazidima (30 µg) e imipenem (30 µg) como indicadores, posicionados ao lado de discos esterilizados de papel-filtro contendo os quelantes: 3 µL de solução de ácido 2-mercaptopropiônico (2-MPA) e outro contendo 10 µL de solução de ácido-etileno-diamino-tetracético (EDTA) 0,1 M, em distâncias pré-determinadas: 20 mm para o disco de 2-MPA e 15 mm para o disco de EDTA.

As placas foram incubadas *overnight* a 37°C, e a observação de distorção e/ou aumento no halo de inibição em torno dos discos indicadores caracterizou o teste positivo para presença de MBL. Como amostras controles foram utilizadas *P. aeruginosa* ATCC 27853 (controle negativo) e *P. aeruginosa* P-319 (controle positivo).

### **3.5. Técnicas Moleculares**

#### **3.5.1. Extração de DNA**

Foi realizada de acordo com o método descrito por Jin e colaboradores (2009), com modificações. Amostras de *P. aeruginosa* foram cultivadas *overnight* a 37°C, em TSA, e 5 a 6 colônias foram transferidas para microtubos contendo 500µL de água ultrapura e então homogeneizadas em agitador tipo Vortex. A suspensão resultante foi aquecida a 99°C por 10 minutos no termociclador *Eppendorf Mastercycler*, e o sobrenadante com DNA extraído foi transferido para outro tubo, quantificado por espectrofotometria e conservado a -20°C até a utilização.

#### **3.5.2. Detecção dos genes codificadores de MBL pela técnica de Multiplex PCR**

Para a detecção dos genes codificadores de MBL foi utilizado o método de PCR multiplex de acordo com Woodford (2010). Os *primers* utilizados nas reações estão descritos no quadro 3 e correspondem a regiões específicas dos genes codificadores das carbapenemases.

**Quadro 3:** *Primers* específicos para detecção dos genes codificadores de carbapenemases.

<b>MβL</b>	<b>Primer</b>	<b>Sequência (5' - 3')</b>	<b>Produto da amplificação (pb)</b>
<i>bla<sub>IMP</sub></i>	IMPgen-F1	GAATAGRRTGGCTTAAYTCTC	188
	IMPgen-R1	CCAAACYACTASGTTATC	
<i>bla<sub>VIM</sub></i>	VIMgen-F2	GTTTGGTCGCATATCGCAAC	382
	VIMgen-R2	AATGCGCAGCACCAGGATAG	
<i>bla<sub>GIM</sub></i>	GIM-F1	TCAATTAGCTCTTGGGCTGAC	72
	GIM-R1	CGGAACGACCATTGGAATGG	
<i>bla<sub>SIM</sub></i>	SIM-F1	GTACAAGGGATTTCGGCATCG	569
	SIM-R1	TGGCCTGTTCCCATGTGAG	
<i>bla<sub>SPM</sub></i>	SPM-F1	CTAAATCGAGAGCCCTGCTTG	798
	SPM-R1	CCTTTTCCGCGACCTTGATC	

As amostras foram cultivadas em TSA para isolamento de colônias puras. Três a cinco colônias de cada amostra foram transferidas para um microtubo contendo 200 µL de água deionizada estéril. Esta suspensão foi utilizada diretamente para a etapa de amplificação do gene.

Em cada tubo foi adicionado 1 µL da suspensão da bactéria teste, tampão de PCR com MgCl<sub>2</sub>, dNTPs e os primers descrito acima, Taq DNA polimerase e água ultra pura, nas quantidades descritas no protocolo.

A amplificação foi realizada no *Eppendorf Mastercycler*, programado de acordo com as condições descritas no quadro 4. A eletroforese ocorreu a 100v por cerca de 60 minutos em agarose 1,5%, no tampão de corrida TBE 0,5X. O gel foi corado com 5 µL de SYBER® Safe (Applied Biosystems) para cada 100 mL de tampão e então visualizado utilizando um transluminador.

Como controles para as reações de amplificação dos genes codificadores de MβL, foram utilizadas as seguintes cepas, sabidamente produtoras de MβL: *P. aeruginosa* 48-1997A produtora de SPM; *P. aeruginosa* 75-5671 produtora de GIM, *P. aeruginosa* A1254 produtora de VIM; *P. aeruginosa* 101-4704 produtora de IMP e *A. baumannii* YMC03/9/T104 produtora de SIM.

**Quadro 4:** Condições para amplificação nas reações de detecção dos genes codificadores de carbapenemases por PCR.

	<b>Multiplex para genes MBL<sup>1</sup></b>
Desnaturação inicial	94°C por 5 min
Desnaturação	94°C por 30 seg.
Anelamento	53°C por 45 seg.
Extensão	72°C por 30 seg.
Extensão final	72°C por 10 min

<sup>1</sup>WOODFORD, 2010

### 3.5.3. Tipagem molecular pelo PFGE (*Pulsed Field Gel Eletrophoresis*)

A técnica de PFGE foi realizada seguindo o protocolo descrito por Romão e colaboradores (2005), com modificações. As amostras de *P. aeruginosa* foram inicialmente cultivadas em Agar TSA a 37°C *overnight*. A seguir, 5 (cinco) colônias foram suspensas em 2 mL de salina estéril e centrifugadas (700 x g por 5 minutos), o sedimento foi ressuspenso em 2mL de salina estéril e centrifugado (700 x g por 5 minutos). O sobrenadante foi descartado e ao *pellet* foram adicionados: 30 µL de 50 mM de EDTA (pH = 8,0), 10 µL de solução de lisozima (10 mg/ml) e 200 µL de solução TEN (100 mM Tris – 100 mM EDTA - 150 mM de NaCl, pH = 7,5). Um volume de 240 µL 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) estocados a 4°C até o uso.

### 3.5.4. Digestão com endonucleases de restrição

Antes da restrição, os blocos foram lavados quatro vezes com solução de DNS (20mM Tris - 1 mM MgCl<sub>2</sub>) 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 SpeI (Invitrogen®) e incubado durante 20h por 37°C.

### 3.5.5. 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) e 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.

### 3.6. Análise pelo Comitê de Ética

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

### 3.7. 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  $\chi^2$  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 60 pacientes com PAV causada por *P. aeruginosa*, no período de março de 2011 a novembro de 2012, sendo incluído apenas o primeiro episódio de cada paciente, e com valor de CPIS  $\geq 6$ , sendo que todos os episódios foram monomicrobianos.

A maioria das amostras bacterianas foram resistentes aos carbapenêmicos (53,4%) e dentre estas, a maioria das PAVs foram classificadas como tardia (96,9% vs 57,1%  $p=0,006$ ), quando comparadas as sensíveis, com tempo de uso de ventilação mecânica maior que quarenta dias (40,6% vs 14,3%  $p=0,04$ ), e o diagnóstico clínico como a principal motivo de admissão na unidade (56,2% vs 25%  $p=0,02$ ).

Dentre as co-morbidades analisadas, o único fator significativo na análise univariada foi DPOC (21,9% vs 7,1%  $p=0,04$ ) e entre os procedimentos invasivos destacou-se a traqueostomia (81,2% vs 64,3%  $p=0,02$ ). Foram utilizados como antibioticoterapia prévia os carbapenêmicos, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, cefalosporinas de 3° e 4° geração e polimixina, sendo significativo apenas o uso de carbapenêmicos (59,6% vs 28,6%  $p=0,03$ ) e polimixina (28,1% vs 0,0%  $p=0,002$ ).

A mortalidade durante o período de hospitalização foi elevada (68,7% vs 50,0%  $p=0,2$ ) embora no total de trinta dias as taxas foram semelhantes (25,0% vs 25,0%  $p=0,7$ ), sendo esses dados melhor visualizados na tabela 1. Embora vários fatores mostrassem uma relação significativa ( $p<0,05$ ), após a análise de regressão logística múltipla nenhum dos fatores mostrou-se como independente para PAV, quando das amostras resistentes aos carbapenêmicos.

**Tabela 1:** As características dos pacientes e fatores de risco de PAV causada por *Pseudomonas aeruginosa* em UTI-A do HC-UFU.

(continua)

Características	Pacientes N=60 (%)	Sensível N=28 (46,6)	Resistente N=32 (53,4)	P	RR (IC-95%)
Tempo de hospitalização ( $\geq 60$ dias)	27 (45,0)	12 (42,8)	15 (46,8)	0,9	1,08 (0,67-1,73)
Tempo de internação na UTI ( $\geq 40$ dias)	19 (31,6)	6 (21,4)	13 (40,6)	0,1	1,48 (0,94-2,31)
Tempo de uso de ventilação mecânica ( $\geq 40$ dias)	17 (28,3)	4 (14,3)	13 (40,6)	0,04	1,73 (1,13-2,65)
Idade ( $\geq 60$ anos)	24 (40,0)	10 (35,7)	14 (43,75)	0,7	1,17 (0,73-1,87)
<b>Gênero</b>					
Masculino	47 (78,3)	22 (78,6)	25 (78,1)	0,7	0,99 (0,56-1,75)
Feminino	13 (21,7)	6 (21,4)	7 (21,9)	0,7	1,01 (0,57-1,79)
<b>Categoria de Internação</b>					
Clínico	25 (41,7)	7 (25,0)	18 (56,2)	0,02	2,52 (1,80-4,49)
Cirúrgico	13 (21,6)	8 (28,6)	5 (16,6)	0,3	0,67 (0,32-1,39)
Trauma	22 (36,7)	13 (46,4)	9 (28,1)	0,2	0,68 (0,38-1,19)
<b>Co-morbidades</b>					
Cardiopatia	19 (31,6)	9 (32,1)	10 (31,2)	0,8	0,98 (0,59-1,64)
Diabetes	12 (20,0)	4 (14,3)	8 (25,0)	0,4	1,33 (0,82-2,18)
Nefropatia	31 (43,3)	12 (42,8)	19 (59,4)	0,3	1,37 (0,84-2,23)
DPOC	9 (15,0)	2 (7,1)	7 (21,9)	0,04	1,59 (1,01-2,48)



**Tabela 1:** As características dos pacientes e fatores de risco de PAV causada por *Pseudomonas aeruginosa* em UTI-A do HC-UFU.

Características	Pacientes N=60 (%)	Sensível N=28 (46,6)	Resistente N=32 (53,4)	P	(continuação) RR (IC-95%)
<b>Procedimentos invasivos</b>					
Cateter venoso central	58 (96,6)	27 (96,4)	31 (96,9)	0,5	1,07 (0,26-4,36)
Sonda vesical	57 (95,0)	28 (100,0)	29 (90,6)	0,2	0,51 (0,39-0,66)
Sonda Nasogástrica	55 (91,6)	25 (89,3)	30 (93,7)	0,6	1,36 (0,45-4,10)
Traqueostomia	44 (73,3)	18 (64,3)	26 (81,2)	0,02	3,55 (0,98-12,86)
Dreno Torác	17 (28,3)	11 (39,3)	6 (18,7)	0,1	0,58 (0,29-1,16)
<b>Cirurgia</b>	42 (70,0)	20 (71,4)	22 (68,7)	0,9	0,94 (0,57-1,56)
<b>CPIS ≥ 8</b>	37 (61,6)	14 (50,0)	23 (71,8)	0,1	1,59 (0,90-2,80)
<b>Índice de Co-morbidade Charlson ≥ 5</b>	38 (63,3)	15 (53,6)	23 (71,8)	0,8	1,36 (0,37-5,03)
<b>PAV</b>					
Precoce	13 (21,6)	12 (42,8)	1 (3,1)	0,006	0,12 (0,02-0,78)
Tardia	47 (78,3)	16 (57,1)	31 (96,9)	0,006	8,57 (1,29-57,0)
<b>Uso Prévio de Antibióticos</b>					
N≥2	51 (85,0)	23 (82,1)	28 (87,5)	0,7	1,24 (0,57-2,67)
Carbapenêmicos	27 (45,0)	8 (28,6)	19 (59,6)	0,03	1,79 (1,10-2,91)
Fluoroquinolonas	10 (16,6)	3 (10,7)	7 (21,9)	0,3	1,40 (0,86-2,29)
Aminoglicosídeos	2 (3,3)	0 (0,0)	2 (6,2)	0,4	1,93 (1,51-2,48)
Cefalosporinas 3° e 4° geração	46 (76,6)	24 (85,7)	22 (68,7)	0,2	0,67 (0,43-1,05)
Polimixina	9 (15,0)	0 (0,0)	9 (28,1)	0,002	2,22 (1,64-3,0)

**Tabela 1:** As características dos pacientes e fatores de risco de PAV causada por *Pseudomonas aeruginosa* em UTI-A do HC-UFU.

Características	Pacientes N=60 (%)	Sensível N=28 (46,6)	Resistente N=32 (53,4)	P	(conclusão)
					RR (IC-95%)
<b>Mortalidade</b>					
Precoce	14 (23,3)	5 (17,8)	9 (28,1)	0,5	1,29 (0,79-2,09)
Trinta dias	15 (25,0)	7 (25,0)	8 (25,0)	0,7	1,0 (0,42-2,41)
Total	38 (63,3)	14 (50,0)	22 (68,7)	0,2	1,47 (0,85-2,52)

UTI: Unidade de Terapia Intensiva; DPOC: Doença pulmonar obstrutiva crônica; CPIS: Índice de Co-morbidade de Charlson; RR: Risco Relativo.

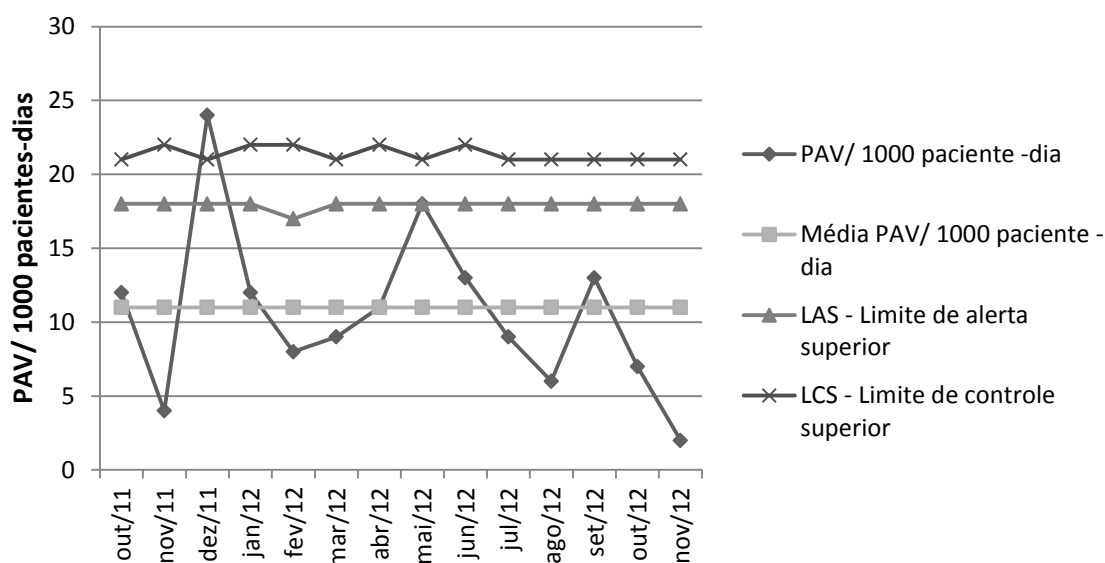
As taxas de pneumonia associada à ventilação mecânica estão na tabela 2. A taxa de incidência de PAV na unidade foi de 9,1/1000 pacientes-dia, enquanto PAV por *P. aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* por 1000/pacientes-dia foi 4,6 e 3,8 respectivamente, sendo *P. aeruginosa* o principal micro-organismo encontrado nas PAVs no período de estudo.

**Tabela 2:** Incidência de Pneumonia associada a ventilação mecânica (PAV) em pacientes internados na UTI de adultos.

Variáveis	Taxas
PAV /1000 pacientes-dia	9,1
PAV / 1000 dias de Ventilação Mecânica	17,5
Densidade de uso de Ventilador Mecânico	0,51
PAV por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> / 1000 pacientes-dia	4,6
PAV por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> / 1000 dias de Ventilação Mecânica	9,1
PAV por <i>Staphylococcus aureus</i> / 1000 pacientes-dia	3,8
PAV por <i>Staphylococcus aureus</i> /1000 dias de Ventilação Mecânica	7,4
PAV por <i>Acinetobacter baumannii</i> / 1000 pacientes-dia	2,1
PAV por <i>Acinetobacter baumannii</i> /1000 dias de Ventilação Mecânica	4,2

PAV; Pneumonia associada a Ventilação Mecânica

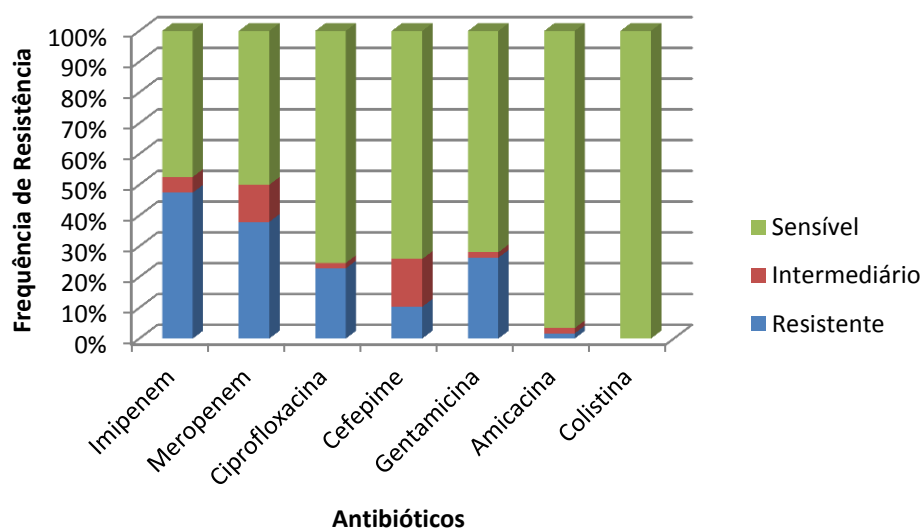
No presente estudo, as taxas de ocorrência de PAV/1000 pacientes dia correspondente ao mês de dezembro de 2011 foi de 24,1/1000 pacientes dia, mais alta que o limite de controle estabelecido em  $3\sigma$  (três desvios padrão) acima da média de incidência de casos de infecção, o que pode ser descrito como um surto (Fig. 1). A taxa de PAV foi de 4,0/1000 pacientes-dia no início de novembro de 2011 e caiu para 12,0/1000 pacientes-dia no final do mês de janeiro de 2012, quando foi observado o término do surto de PAV e início de um período com taxas endêmicas.



**Figura 1:** Curva endêmica de Pneumonia associada a ventilação mecânica por 1000 pacientes dia, de outubro de 2011 a novembro de 2012.

PAV; Pneumonia associada ventilação mecânica.

A análise do perfil de resistência aos demais antimicrobianos pseudomonicidas evidenciou que entre 32 amostras que apresentaram resistência aos carbapenêmicos, 31% foram resistentes ao imipenem, 29% resistente ao meropenem, 16% a gentamicina, 15% a cefepime, 14% a ciprofloxacina e 2% a amicacina. A resistência à polimixina não foi detectada em nenhuma das amostras incluídas no estudo. (Fig 2)



**Figura 2:** Perfil de resistência aos antimicrobianos de amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas na UTI-A do HC-UFG.

*P. aeruginosa* multirresistente (MDR) foram recuperadas a partir de 15 (33,3%) dos casos de PAV tardia, enquanto as precoces apresentaram-se em 1 (6,7%) dos diagnósticos. PAV por *P. aeruginosa* sensível a carbapenêmicos acometeram de modo semelhante 14 (31,2%) e 14 (93,3%) entre as PAVs tardias e precoce, como pode ser observado na tabela 3, existindo significância estatística em todos os perfis avaliados.

**Tabela 3:** Multirresistência de *P. aeruginosa* recuperada de pacientes com pneumonia associada a ventilação mecânica precoce e tardia na UTI-A do HC-UFU no período de março de 2011 a novembro de 2012.

Perfil de Resistência		PAV precoce 15 (25,0%)	PAV tardia 45 (75,0%)	Total 60 (100%)	<i>p</i>	OR (IC-95%)
Resistente aos carbapenêmicos		0 (0,0%)	16 (35,5%)	16 (26,7%)	0,006	0,00(0,00-0,71)
	Multirresistente	1 (6,7%)	15 (33,3%)	16 (26,7%)	0,04	0,14(0,01-1,23)
Sensível aos carbapenêmicos		14 (93,3%)	14 (31,2%)	28 (46,6%)	0,05	8,86(0,79-228,85)

PAV; Pneumonia associada a ventilação mecânica; RR; Risco relativo.

Baseados no teste de susceptibilidade aos antibióticos foram identificados 10 antibiótipos (R1-R10) entre as amostras de *P. aeruginosa*, 13 (44,8%) foram identificadas fenotipicamente como positivas para a presença de MBL, mas apenas uma (3,4%) amostra foi genotipicamente positiva para o gene *bla<sub>IMP</sub>*. No entanto essa amostra positiva no teste genotípico foi negativa no teste fenotípico, sendo considerada um falso-negativo. Alguns genes MBL não foram testados devido a não prevalência no Brasil (*bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>AIM</sub>*, *bla<sub>KHM</sub>*, *bla<sub>DIM</sub>*, *bla<sub>TMB</sub>*). A tabela 4 a seguir mostra estes dados.

**Tabela 4:** Caracterização em isolados de *Pseudomonas aeruginosa*, como teste de MBL, antibiótipo, perfil de resistência.

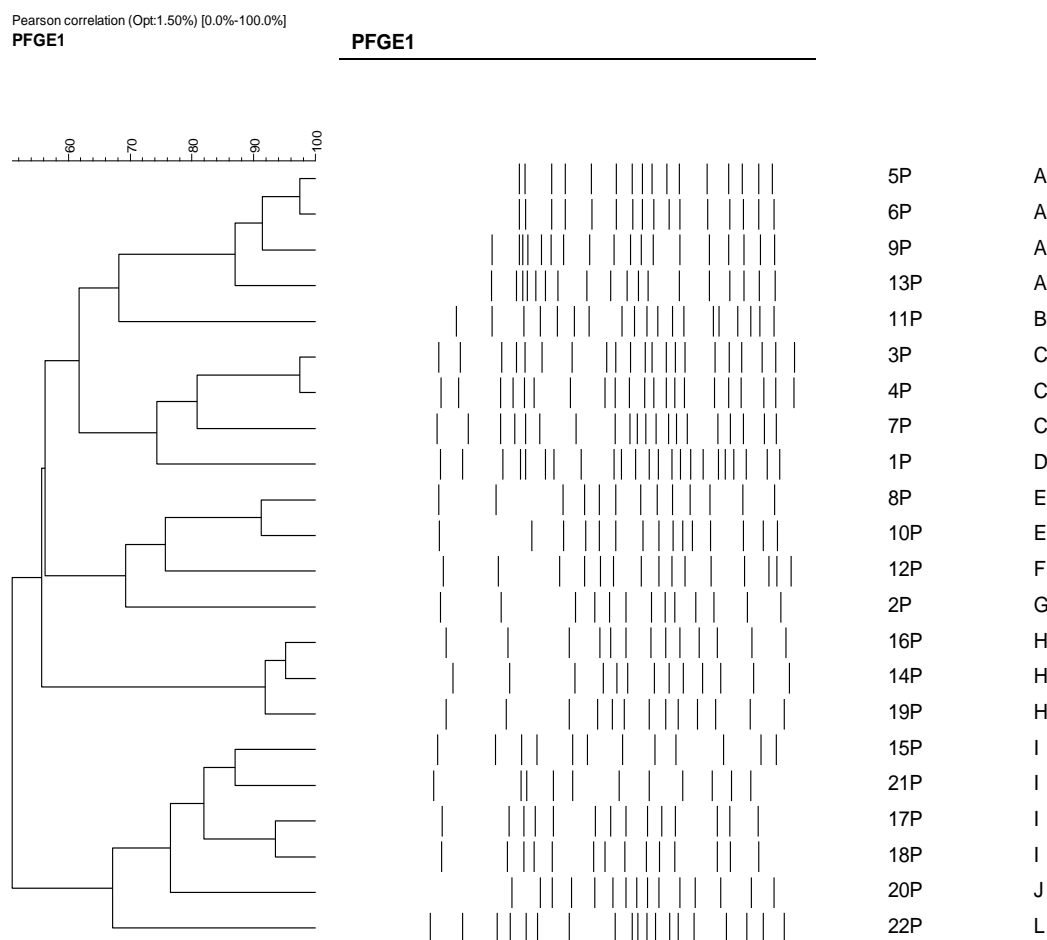
PARC <sup>1</sup> N (%)	PARC Analisadas N (%)	Antibiótipo	Perfil de Resistência	PARC/Antibiótipo N= 29 (%)	DDST <sup>2</sup> N= 13 (%)	PCR <sup>3</sup> Pb/gene N= 1 (%)
32 (53,3)	29 (90,6)	R1	CIP <sup>7</sup> , GEN <sup>8</sup> , IMP <sup>5</sup> , MER <sup>6</sup> , PPT <sup>10</sup> , AMI <sup>9</sup> , CPM <sup>4</sup>	1(3,4)	Negativo	Negativo
		R2	CIP, GEN, IMP, MER, AMI, CPM	1(3,4)	Negativo	Negativo
		R3	CIP, GEN, IMP, MER, PPT, CPM	1(3,4)	1(7,7)	Negativo
		R4	CIP, GEN, IMP, MER, CPM	7 (24,2)	4 (30,7)	Negativo
		R5	CIP, IMP, MER, PPTAZ, CPM	1(3,4)	Negativo	Negativo
		R6	ASB <sup>11</sup> , CIP, GEN, IMP, MER	1(3,4)	Negativo	Negativo
		R7	CIP, IMP, MER, GEN	4 (13,8)	1(7,7)	188/ <i>bla</i> <sub>IMP</sub>
		R8	IMP, MER, CPM	1(3,4)	Negativo	Negativo
		R9	IMP, MER	8 (27,6)	4 (30,7)	Negativo
		R10	IMP	4 (13,8)	3(23,1)	Negativo

<sup>1</sup>*Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenêmicos; <sup>2</sup>Teste de Sinergismo de Duplo Disco; <sup>3</sup>Polymerase Chain Reaction; <sup>4</sup>Cefepime; <sup>5</sup>Imipenem; <sup>6</sup>Meropenem; <sup>7</sup>Ciprofloxacina; <sup>8</sup>Gentamicina; <sup>9</sup>Amicacina; <sup>10</sup>Piperacilina-tazobactam; <sup>11</sup>Ampicilina-sulbactam.

A similaridade genética recuperada de aspirado traqueal foi realizada por meio da técnica de PFGE e incluiu 29 amostras de *P. aeruginosa*, sendo 23 resistentes e 6 sensíveis aos carbapenêmicos (figura 3). Os resultados obtidos gerou um dendograma de similaridade genética apresentado na mesma figura. No total, foram encontrados 11 perfis genotípicos distintos de *P. aeruginosa* diferenciados entre si por um coeficiente de similaridade acima de 95%, 23 correspondendo a PARC (A, B, C, D, E, F, G, H, L) e 6 a cepa susceptível (H, I, J), com um (tipo I) e três (A, C, H), padrões predominantes, respectivamente.

Entre as amostras de *P. aeruginosa* sensíveis a carbapenêmicos, o pulsotipo I foi evidenciado em 18,2% das amostras testadas, enquanto que os tipos A, C e H foram detectados em 36,4%. O mesmo perfil clonal foi observado em amostras correspondentes ao mesmo paciente (aspirado e sangue) em duas oportunidades, incluídas aleatoriamente.

Esses dados, assim como os perfis genotípicos (A a L) das amostras analisadas estão na tabela 5 (imagem do gel de agarose encontra-se no ANEXO III).



**Figura 3:** Dendograma resultante da análise em eletroforese em campo pulsado (PFGE), perfil de amostras isoladas de pacientes na UTI-A do HC-UFU.

**Tabela 5:** Genótipos e perfis de resistência de isolados de sangue e aspirado traqueal de amostras de *Pseudomonas aeruginosa* em uma UTI-A.

Paciente	Origem	Data de Isolamento	PFGE	DDST	PCR	Perfil de Resistência
1	Sangue	14/12/2011	A	MBL		Resistente
1	Aspirado traqueal	10/12/2011	A			Resistente
2	Aspirado traqueal	31/07/2011	A	MBL		Resistente
3	Aspirado traqueal	04/02/2012	A	MBL		Resistente
4	Aspirado traqueal	26/12/2011	B	MBL		Resistente
5	Sangue	10/09/2011	C	MBL	SPM	Resistente
5	Aspirado traqueal	02/09/2011	C	MBL		Resistente
6	Aspirado traqueal	06/05/2011	C	MBL		Resistente
4	Sangue	27/06/2011	D	MBL		Resistente
7	Aspirado traqueal	08/08/2011	E	MBL		Resistente
8	Aspirado traqueal	13/01/2012	E	MBL		Resistente
9	Aspirado traqueal	01/08/2011	F	MBL		Resistente
10	Aspirado traqueal	04/10/2012	G			Resistente
11	Aspirado traqueal	08/03/2012	H	MBL		Resistente
12	Aspirado traqueal	20/09/2012	H			Sensível
13	Aspirado traqueal	10/04/2012	H	MBL		Resistente
14	Aspirado traqueal	05/08/2011	I			Sensível
15	Aspirado traqueal	14/09/2011	I			Sensível
16	Aspirado traqueal	08/09/2011	I			Sensível
17	Aspirado traqueal	01/08/2011	I			Sensível
18	Aspirado traqueal	05/08/2011	J			Sensível
19	Aspirado traqueal	07/06/2011	L			Resistente

DDST: Teste de Sinergismo de Duplo Disco; PCR: Polymerase Chain Reaction; MBL: metalo- $\beta$ -lactamases; SPM: São Paulo.



## 5. DISCUSSÃO

As infecções hospitalares são muito prevalentes nas UTIs e estão constantemente associadas com maiores taxas de morbidade, mortalidade, tempo de hospitalização e aumento dos custos, implicando em um pior prognóstico (HAN; LIU, 2010). Entre as infecções hospitalares a pneumonia é a infecção mais frequente nas UTIs tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento, com taxas de incidência elevadas, podendo atingir 25% do total das infecções, aumentando de forma significativa quando os pacientes estão sob o uso de ventilação mecânica (BONTEN et al., 2005; JOSEPH et al., 2010). Entretanto estas taxas variam significativamente considerando a população estudada e os critérios de diagnóstico utilizados (XIE et al., 2011).

Em países em desenvolvimento, as taxas de PAVs variam de 10 a 52 por 1000 ventiladores dia e geralmente são mais elevadas do que nos EUA e alguns países europeus (ROSENTHAL et al., 2006; ARABE et al., 2008). No nosso estudo, o diagnóstico de PAV foi realizado utilizando critérios clínicos, radiológicos, microbiológicos e o score CPIS, com a detecção de taxas de 9,1/1000 ventiladores dia, inferiores as encontradas em outros estudos sobre essa síndrome. Já a densidade de utilização de ventilação mecânica foi alta (0,51) e analisando o gráfico da curva endêmica de PAV/paciente dia, foi possível observar um pico acima do limite de controle superior no mês de dezembro, indicativo de um surto ocorrido no período.

As taxas de incidência de pneumonia variam de 5-10/1000 pacientes-dia em pacientes ventilados (KOLLEF, 2005) e está intimamente relacionada ao tempo de ventilação mecânica, com um risco mais alto nos primeiros dias de dispositivo (DAVIS, 2006). Rocha (2012) demonstrou que a ocorrência de PAV é comum na UTI de adultos do HC-UFU, com taxa de incidência de 15,6/1000 pacientes-dia e está associada a um pior prognóstico. Estudo realizado na UTI de um hospital Iraniano, mostrou uma incidência de PAV de 26,23/1000 pacientes-dia (LAHOORPOUR et al., 2013) e no presente estudo a taxa foi de 4,6/1000 pacientes dia, portanto inferior encontrado na literatura.

Os micro-organismos causadores de PAVs variam de acordo com a característica da unidade, política de uso de antibióticos, padrões de resistência aos antimicrobianos, tempo de internação e uso de ventilação mecânica (HUNTER, 2006). Mas aproximadamente 10% das infecções hospitalares são causadas por *P. aeruginosa* com participação importante nas infecções de trato urinário (31%) e corrente sanguínea (19%), além de ser o principal

agente de pneumonia nos hospitais brasileiros (31,2%), particularmente aquelas associadas a ventilação mecânica nas UTIs (MODI; JAVADEKAR; JAVADEKAR, 2011; GALES et al., 2012). Esta alta incidência está associada particularmente a pacientes com fatores de risco como: co-morbidades pré-existentes, tempo de internação longo, uso de antibiótico de amplo espectro e aqueles sujeitos a procedimentos invasivos, como uso de cateteres vasculares e ventilação mecânica, que fazem com que a UTI seja um local propício para a disseminação da *P. aeruginosa*, muitas vezes resultando com altos níveis de morbimortalidade (RODRIGUES et al., 2009; VOOR IN'T HOLT et al., 2014). Encontramos no nosso estudo muitos desses fatores pela análise univariada, entretanto nenhum dos fatores avaliados foi independentemente associado com aquisição de PAV por PARC. De acordo com outras publicações (FURTADO et al., 2009; JOSEPH et al., 2010; PEÑA et al., 2013) o tempo de uso de ventilação mecânica esta comumente relacionado com o desenvolvimento de PAV. Na nossa investigação cerca de um terço dos pacientes faziam uso de ventilação mecânica por mais de quarenta dias.

Em países como o Brasil, alguns problemas são comuns em hospitais gerais, como controle deficiente no uso de antimicrobianos e falta ou ineficiência de laboratórios de microbiologia, fatores que contribuem para uma maior resistência e multirresistência aos antimicrobianos nestas instituições (ROSSI, 2011). O surgimento da MDR em *P. aeruginosa* é um problema de inquietação global, e atualmente há relatos de surtos hospitalares por este micro-organismo em países de todo o mundo (VOOR IN'T HOLT et al., 2014). E a resistência antimicrobiana, neste micro-organismo, está relacionada com ampla expressão de fatores de virulência, bem como resistência intrínseca e adquirida a várias classes de antibióticos decorrentes de distintos mecanismos (TRABULSI et al., 2003). Os carbapenêmicos aparecem como escolha terapêutica no tratamento de infecções graves por *P. aeruginosa*, entretanto seu uso tem sido ameaçado principalmente pelo aumento da incidência de cepas resistentes a esta classe de antibióticos (GALES et al., 2003; QUALE et al., 2006). No nosso estudo, a exemplo do que está sendo observado em outros países da América Latina (ROSENTHAL et al., 2006; GALES et al., 2012), cerca da metade das PAVs causadas por PARC estão associadas a amostras MDR.

O teste de sensibilidade aos antimicrobianos mostrou que 13 de 32 das amostras de PARC também foram resistentes simultaneamente a quatro outros antibióticos (cefepime, ciprofloxacina, gentamicina, amicacina) e sensível a uma, apenas a colistina.

A resistência aos carbapenêmicos em *P. aeruginosa*, como descrito ocorre

principalmente pela produção MBLs. (GALES et al., 2003; QUALE et al., 2006; CEZARIO et al., 2009; SCHEFFER et al., 2010). Além destas enzimas, a resistência a carbapenêmicos pode estar associada a outros mecanismos como: perda de porinas de membrana externa (OprD); hiperexpressão de bombas de efluxo em combinação com a hiperprodução de AmpC cromossomal induzível (WALTHER-RASMUSSEN; HØIBY, 2006).

Estes mecanismos podem ser expressos isoladamente ou combinados e desempenham papel importante na resistência múltipla aos antimicrobianos aumentando, consequentemente, a probabilidade de ocorrer terapia antimicrobiana inapropriada (JACOBY; MUNHOZ-PRICE, 2005). A nossa investigação evidenciou apenas um (3,4%) isolado com a presença do gene *blaIMP*, e negativo no DDST, sendo considerado um falso negativo. Observamos também uma diferença na detecção da produção de carbapenemase pelo DDST, que detectou 13 (44,8%) isolados positivos. Porém alguns MBL, como *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>AIM</sub>*, *bla<sub>KHM</sub>*, *bla<sub>DIM</sub>*, *bla<sub>TMB</sub>* não foram testados devido à sua não-prevalência no Brasil. Isso se justifica provavelmente pela coexistência de outros mecanismos como a perda de porina ou a superexpressão de bomba de efluxo.

As amostras de PARC presentes no trabalho revelou importante mudança epidemiológica quando relacionados a amostras do período entre 2005 e 2009. Neste período, Cezário et al. (2009) descreveram um surto por *P. aeruginosa* resistente a carbapenêmico produtora de MBL positivo para *bla<sub>SPM-1</sub>*, por transmissão horizontal em pacientes internatos nesta UTI mista.

Nos estudos epidemiológicos, a discriminação das amostras é passível de ser realizada por técnicas fenotípicas clássicas, como por exemplo, utilizando o perfil de resistência aos antibióticos (GEHANNO et al., 2009), porém a adoção de métodos moleculares permite uma melhor discriminação (HARRIS et al., 2010). Em relação a *P. aeruginosa*, a técnica de PFGE é considerada pela literatura internacional com uma técnica de alto poder discriminatório na identificação das amostras, contribuindo para delinear melhores medidas de prevenção e controle deste micro-organismo nos hospitais (TENOVER; ARBEIT; GOERING, 1997). A análise da clonalidade das amostras de *P. aeruginosa*, resistentes e sensíveis aos carbapenêmicos neste trabalho, realizada pela técnica de PFGE, revelou grande diversidade de genótipos, isso pode ser justificado pela natureza endêmica das amostras como reportado em diversas literaturas (GALES et al., 2004; ZAVASCKI et al., 2006; CIPRIANO et al., 2007).

A transmissão de infecções por micro-organismos MDR quando de predominância clonal, caracteriza disseminação horizontal, sobretudo pelas mãos dos profissionais de saúde, enquanto a presença de vários clones evidencia uma política inadequada de uso de antibióticos, sobretudo quando em condições endêmicas (WIDMER et al., 1993; PATERSON, 2002; ORTEGA; GROENEVELD; SCHULTSZ, 2004; RODRIGUES et al., 2009). A avaliação da distribuição das linhagens de *P. aeruginosa* mostrou que há diferença genética entre as cepas isoladas em diferentes pacientes, entretanto, em duas oportunidades, em um mesmo indivíduo observou-se similaridade entre as amostras de PAV e sangue, o que nos permite inferir sobre a possibilidade de migração microbiana do sistema respiratório para o sangue.

Este estudo tem limitações que devem ser consideradas na interpretação dos resultados. Em primeiro lugar, o estudo foi realizado em um único hospital levantando a possibilidade de viés na seleção dos pacientes, segundo o tamanho relativamente pequeno das amostras incluídos na investigação não tem poder estatístico para identificar fatores de risco importantes para o desenvolvimento de PAV.

## 6. CONCLUSÕES

O principal diagnóstico de entrada do paciente quando da admissão na Unidade foi o clínico, com a maioria das PAVs classificadas como tardias (96,9%), resistentes aos carbapenêmicos (53,4%), traqueostomia, DPOC, uso de ventilação mecânica  $\geq 40$  dias e o uso prévio de polimixina e carbapenêmico foram significativas na análise univariada. A taxa de incidência foi 17,5 PAV/1000 dias de ventilação mecânica e 0,51 densidade de uso de ventilação mecânica, sendo que *P. aeruginosa* foi principal agente etiológico com 35,2%.

Os pacientes com PAV por amostras de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos apresentaram uma maior taxa de mortalidade do que aqueles infectados pelas amostras susceptíveis (68,7% vs. 50,0%).

O teste fenotípico para amostras resistentes aos carbapenêmicos foi positivo para 44,8% das amostras, evidenciando baixa especificidade, sendo que nenhuma das mesmas mostrou-se positiva no teste genotípico. Por outro lado, apenas uma (3,4%) amostra foi positiva neste último teste, sendo do gene *bla<sub>IMP</sub>* e as amostras testadas mostraram um perfil policlonal, reflexo da natureza endêmica do período da investigação, com 11 perfis distintos, e com a predominância de 4 clones (I, A, C e H).

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALP, E.; VOSS, A. Ventilator associated pneumonia and infection control. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 5, n. 7, p. 1-11, 2006.

ARAKAWA, Y.; SHIBATA, N.; SHIBAYAMA, K.; KUROKAWA, H.; YAGI, T.; FUJIWARA, H.; GOTO, M. Convenient test for screening metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 40-43, 2000.

BONTEN, M. J.; CASTRE, J.; CRAIG, W. A.; FAGON, J.; HALL, J.; JACOBY, G. A.; KOLLEF, M. H.; LUNA, C. M.; MANDELL, L. A.; TORRES, A.; WUNDERINK, R. G. Guidelines for the Management of Adults with Hospital-acquired, Ventilator-associated, and Healthcare-associated Pneumonia. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 171, n. 4, p. 388-416, 2005.

BONTEN, M. J. Ventilator-Associated Pneumonia: Preventing the Inevitable. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. 1, p. 115-121, 2011.

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

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. Conference summary: ventilator-associated pneumonia. **Respiratory Care**, v. 50, n. 7, p. 975-983, 2005.

ÇILDIR, E.; BULUT, M.; AKALIN, H.; KOCABAŞ, E.; OCAKOĞLU, G.; AYDIN, Ş. A.

Evaluation of the modified MEDS, MEWS score and Charlson comorbidity index in patients with community acquired sepsis in the emergency department. **Internal and Emergency Medicine**, v. 8, n. 3, p. 255-260, 2013.

CIPRIANO, R.; VIEIRA, V. V.; FONSECA, E. L.; RANGEL, K.; FREITAS, F. S.; VIECENTE, A. C. P. Co-existence of epidemic colistin-only-sensitive clones of *Pseudomonas aeruginosa*, including the bla<sub>SPM</sub> clone, spread in Hospitals in a Brazilian Amazon city. **Microbial Drug Resistance**, v. 13, n. 2, p. 142-146, 2007.

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

DIAZ, E.; ULLDEMOLINS, M.; LISBOA, T.; RELLO, J. Management of Ventilator associated pneumonia. **Infectious Diseases Clinical of North America**, v. 23, n. 3, p. 521-533, 2009.

DWIVEDI, M.; MISHRA, A.; AZIM, A.; SINGH, R. K.; BARONIA, A. K.; PRASAD, K. N.; DHOLE, T. N.; DWIVEDI, U. N. Ventilator-associated pneumonia caused by carbapenem resistant Enterobacteriaceae carrying multiple metallo-beta-lactamase genes. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 339-342, 2010.

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.

FEHLBERG, L. C.; XAVIER, D. E.; PERARO, P. P.; MARRA, A. R.; EDMOND, M. B.; GALES, A. C. Beta-Lactam Resistance Mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing bloodstream infections: comparative results between Brazilian and American isolates. **Microbial Drug Resistance**, v. 18, n. 4, p. 402-407, 2012.

FURTADO, G. H.; D'AZEVEDO, P. A.; SANTOS, A. F.; GALES, A. C.; PIGNATARI, A. C.; MEDEIROS, E. A. Intravenous polymyxin B for the treatment of nosocomial

pneumonia caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 30, n. 4, p. 315-319, 2007.

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, p. 625.e9-14, 2009.

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

GALES, A. C.; TORRES, P. L., VILARINHO, D. S.; MELO, R. S.; SILVA, C. F.; CEREDA, R. F. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in an intensive care unit of a teaching hospital. **Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 8, n. 4, p. 267-71, 2004.

GALES, A. C.; CASTANHEIRA, M.; JONES, R. N.; SADER, H. S. Antimicrobial resistance among gram-negative bacilli isolated from latin America: results from SENTRY antimicrobial Suveillance Program (Latin America, 2008-2010). **Diagnostic Microbiology and Infections Diseases**, v. 73, n. 4, p. 354-360, 2012.

GASPARETO, P. B.; MARTINS, A. F.; ZAVASCKI, A. P.; BARTH, A. L. Ocorrencia of bla<sub>SPM-1</sub> and bla<sub>IMP-1</sub> genes of metallo-b-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from three university hospitals in the city of Porto Alegre, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 108-109, 2007.

GEHANNO, J. F.; LOUVEL, A.; NOUVELLON, M.; CAILLARD, J. F.; PESTEL-CARON, M. Aerial dispersal of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospital rooms by infected or colonised patients. **Journal of Hospital Infection**, v. 71, n. 3, p. 256-262, 2009.

GOLIA, S.; SANGEETHA, K. T.; VASUDHA, C. L. Microbial Profile of Early and Late



Onset Ventilator Associated Pneumonia in The Intensive Care Unit of A Tertiary Care Hospital in Bangalore, India. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 7, n. 11, p. 2462–2466, 2013.

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<sub>OXA-51</sub>-like genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 7, p. 2476-83, 2010.

HAN, J.; LIU, Y. Effect of ventilator circuit changes on ventilator-associated pneumonia: a systematic review and meta-analysis. **Respiratory Care**, v. 55, n. 4, p. 467-474, 2010.

HARRIS, S. R.; FEIL, E. J.; HOLDEN, M. T. G.; QUAIL, M. A.; NICKERSON, E. K.; CHANTRATITA, N.; GARDETE, S.; TAVARES, A.; DAY, D.; LINDSAY, J. A.; EDGEWORTH, J. D.; LENCASTRE, H.; PARKHILL, J.; PEACOCK, S. J.; BENTLEY, S. D. Evolution of MRSA During Hospital Transmission and Intercontinental Spread. **Science**, v. 327, n. 5964, p. 469-474, 2010.

HSUEH, P. R.; CHEN, W. H.; LUH, K. T. Relationships between antimicrobial use and antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria causing nosocomial infections from 1991 – 2003 at a university hospital in Taiwan. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, n. 6, p. 463-472, 2005.

HUNTER, J. D. Ventilator associated pneumonia. **Postgraduate Medical Journal**, v. 82, n. 965, p. 172-178, 2006.

JACOBY, G.A.; MUNHOZ-PRICE, L.S. The new  $\beta$ -lactamases. *The New England Journal of Medicine*, v. 352, n. 4, p.380-391, 2005.

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, p. e723-9, 2010.

KIENINGER, A. N.; LIPSETT, P. A. Hospital-acquired pneumonia; pathophysiology, diagnosis and treatment. **Surgical Clinics of North America**, v. 89, n. 2, p. 439-461, 2009.

KOLLEF, M. H. What is ventilator-associated pneumonia and why is it important? **Respiratory Care**, v. 50, n. 6, p. 714-21, 2005.

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

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- $\beta$ -lactamase producing strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 7, n. 2, p. 88-91, 2001.

LISTER, P.D.; WOLTER, D.J.; HANSON, N.D. Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 4, p. 582-610, 2009.

MARTINS, M.; BLAIS, R.; MIRANDA, N. N. Evaluation of the Charlson comorbidity index among inpatients in Ribeirão Preto, São Paulo State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 3, p. 643-652, 2008.

MENDES, R.E.; CASTANHEIRA, M.; PIGNATARI, A.C.; GALES, A.C. Metallo- $\beta$ -lactamases. **Journal of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 42, n. 2, p. 103-113, 2006.

MODI, P.; JAVADEKAR, T.; JAVADEKAR, B. Development of bacteremia in ventilator associated pneumonia patients at a tertiary care hospital, Gujarat - A prospective study. **National Journal of Medical Research**, v. 1, n. 2, p. 23-26, 2011.

NIEDERMAN, M. S. The clinical diagnosis of ventilator-associated pneumonia. **Respiratory Care**, v. 50, n. 6, p. 788-796, 2005.

NIEDERMAN, M. S. Hospital-acquired pneumonia, health care-associated pneumonia, ventilator-associated pneumonia, and ventilator-associated tracheobronchitis: definitions and challenges in trial design. **Clinical Infectious Diseases**, v. 1, n. 51, p. S12-17, 2010.

ORTEGA, B.; GROENEVELD, A. B.; SCHULTSZ, C. Endemic multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in critically ill patients. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 25, n. 10, p. 825-831, 2004.

PATERSON, D. L. Looking for Risk Factors for the Acquisition of Antibiotic Resistance: A 21st-Century Approach. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, n. 12, p. 1564-1567, 2002.

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

PEÑA, C.; GOMEZ-ZORRILLA, S.; ORIOL, I.; TUBAU, F.; DOMINGUEZ, M. A.; PUJOL, M.; ARIZA, J. Impact of multidrug resistance on *Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated pneumonia outcome: predictors of early and crude mortality. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 32, n. 3, p. 413-420, 2013.

POIREL, L.; RODRIGUES-MARTINEZ, J. M.; NAIEMI, N.; DEBETS-OSSENKOPP, Y. J.; NORDMANN, P. Characterization of DIM-1, an integron-encoded metallo-beta-lactamase from a *Pseudomonas stutzeri* clinical isolate in the Netherlands. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 6, p. 2420-2424, 2009.

QUALE, J.; BRATU, S.; GUPTA, J.; LANDMAN, D. Interplay of efflux system, *ampC* and *oprD* expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 5, p. 1633-1641, 2006.

QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. **Clinical**

**Microbiology Reviews**, v. 20, n. 3, p. 440-458, 2007.

RICE, L. B.; SAMH, D.; BONOMO, R. A. **Mechanisms of resistance to antimicrobia agents**. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; YOLKEN, R. H, editors. *Manual of Clinical Microbiology*, Washington DC: ASM Press; p. 1074-1101, 2003.

ROCHA, L. A. **Importância do ambiente (ar e superfície) e das mãos de profissionais de saúde na epidemiologia de pneumonia associada à ventilação mecânica por *Staphylococcus aureus* em unidade de terapia intensiva de adultos**. 2012. 79 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012.

RODRIGUES, P. M.; CARMO NETO, ED.; SANTOS, L. R.; KNIBEL, M. F. Ventilator-associated pneumonia: epidemiology and impact on the clinical evolution of ICU patients. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 11, p. 1084-1091, 2009.

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. 541-548, 2005.

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. Device-associated nosocomial infections in 55 intensive care units of 8 developing countries. **Annals of Internal Medicine**, v. 45, n. 8, p. 582-591, 2006.

ROSSI, F. The chalenges of Antimicrobial Resistance in Brazil. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. 9, p. 1138-1143, 2011.

SAMUELSEN, O.; TOLEMAN, M. A.; SUNDSFJORD, A.; RYDBERG, J.; LEEGAARD, T. M.; WALDER, M.; LIA, A.; RANHEIM, T. E.; RAJENDRA, Y.; HERMANSEN, N. O.; WALSH, T. R.; GISKE, C. G. Molecular epidemiology of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Norway and Sweden shows import of international clones and local clonal expansion. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 1, p. 346-352, 2010.

SCHEFFER, M. C.; BAZZO, M. L.; STEINDEL, M.; DARINI, A. L.; CLÍMACO, E.; DALLA-COSTA, L. M. Intrahospital spread of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a University Hospital in Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 4, 2010.

SESIGUCHI, J.; MORITA, K.; KITAO, T.; WATANABE, N.; OKAZAKI, M.; MIVOSHI-AKIYAMA, T.; KANAMORI, M.; KIRIKAE, T. KHM-1, a novel plasmid-mediated metallo-beta-lactamase from a *Citrobacter freundii* clinical isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 11, p. 4194-4197, 2008.

SHI, S. H.; KONG, H. S.; JIA, C. K.; ZHANG, W. J.; XU, J.; WANG, W. L.; SHEN, Y.; ZHANG, M.; ZHENG, S. S. Risk factors for pneumonia caused by multidrug-resistant Gram-negative bacilli among liver recipients. **Clinical Transplantation**, v. 24, n. 6, p. 758-765, 2010.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V.; MICKELSEN, 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. 2233-2239, 1995.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 18, n. 6, p. 426-439, 1997.

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

TRABULSI, L. R.; ALTHERTHUM, F.; GOMPETZ, O. F.; CANDELAS, J. A. N.; **Microbiologia**, São Paulo: Ateneu, Cap. 49, p.359-368, 2003.

VALENCIA, M.; TORRES, A. Ventilator-associated pneumonia. **Current Opinion in Critical Care**, v. 15, n. 1, p. 30-35, 2009.

VOOR IN'T HOLT, A. F.; SEVERIN, J. A.; LESAFFRE, E. M. E. H.; VOS, M. C. Carbapenem use and medical devices highest risk factors for carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: a systematic review and meta-analyses. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, ahead of print, doi: 10.1128/AAC.01758-13, 2014.

WALSH, T. R.; TOLEMAN, M. A.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 2, p. 306-325, 2005.

WALTHER-RASMUSSEN, J.; HØIBY, N. OXA-type carbapenemases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 3, p. 373-283, 2006.

WANG, H. Y.; CHEW, G.; KUNG, C. T.; CHUNG, K. J.; LEE, W. H. The use of Charlson comorbidity index for patients revisiting the emergency department within 72 hours. **Chang Gung Medical Journal**, v. 30, n. 5, p. 437-444, 2007.

WIDMER, A. F.; WENZEL, R. P.; TRILLA, A.; BALE, M. J.; JONES, R. N.; DOEBBELING, B. N. Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections in a surgical intensive care unit: probable transmission via hands of a health care worker. **Clinical Infectious Diseases**, v. 16, n. 3, p. 372-376, 1993.

WOODFORD, N. **Rapid Characterization of  $\beta$ -lactamases by Multiplex PCR**. In: GILLESPIE, S. H.; MCHUGH, T. D. Antibiotic Resistance Protocols: Second Edition, Methods in Molecular Biology, v. 642, p. 181-192, 2010.

XAVIER, D. E.; PICAIO, R. C.; GIRARDELLO, R.; FEHLBERG, L. C. C.; GALES, A. A. Efflux pumps expression and its association with porin down-regulation and  $\beta$ -lactamase production among *Pseudomonas aeruginosa* causing bloodstream infections in Brazil. **BMC Microbiology**, v. 10, n. 217, p. 1-7, 2010.

XIE, D. S.; XIONG, W.; LAI, R. P.; LIU, L.; GAN, X. M.; WANG, X. H.; WANG, M.;

LOU, Y. X.; FU, X. Y.; WANG, H. F.; XIANG, H.; XU, Y. H.; NIE, S. F. Ventilator-associated pneumonia in intensive care units in Hubei Province, China: a multicentre prospective cohort survey. **Journal of Hospital Infection**, v. 78, n. 4, p. 284-288, 2011.

YONG, D., BELL, J.; RITCHIE, B.; PRATT, R.; TOLEMAN, M. A.; WALSH, T. R. A novel sub group metallo- $\beta$ -lactamase (MBL), AIM-1 emerges in *Pseudomonas aeruginosa* (PSA) from Australia, abstr. C1-593. Abstr. 47th **Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy** (ICAAC), 2007.

YONG, D.; TOLEMAN, M.A.; GISKE, G.C.; CHO, H.S.; SUNDMAN, K.; WALSH, T.R. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla (NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 12, p. 5046-5054, 2009.

ZAVASCKI, A. P.; BARTH, A. L.; FERNANDES, J. F.; MORO, A. L. D.; GONÇALVES, A. L. S.; GOLDANI, L. Z. Reappraisal of *Pseudomonas aeruginosa* hospital-acquired pneumonia mortality in the era of metallo- $\beta$ -lactamase-mediated multidrug resistance: a prospective observational study. **Critical Care**, v. 10, n. 4, p. R114, 2006.

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. 1, n. 51, p. S131-135, 2010.

## ANEXO I

Nome: \_\_\_\_\_

PRT.: \_\_\_\_\_ UTI: \_\_\_\_ Leito: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_

Internação hospitalar: \_\_\_\_\_ Alta Hospitalar: \_\_\_\_\_

Internação UTI: \_\_\_\_\_ Alta UTI: \_\_\_\_\_

Diagnóstico Hospitalar: \_\_\_\_\_

Diagnóstico UTI: \_\_\_\_\_

Ventilação Mecânica: Início \_\_\_\_\_ Fim \_\_\_\_\_

Pneumonia ( ) Bacteremia ( )

Fatores de risco:

( ) Traqueostomia Data: \_\_\_\_\_ ( ) CVC Data: \_\_\_\_\_ ( ) SNG/SNE Data: \_\_\_\_\_ ( ) SVD Data: \_\_\_\_\_

Comorbidades:

( ) Diabetes ( ) HAS ( ) Neoplasia ( ) Doença genética \_\_\_\_\_

( ) Etilista ( ) Tabagista

Antibioticoterapia:

Antibiótico	Início	Fim

Cirurgia: \_\_\_\_\_

Etiologia: \_\_\_\_\_

Perfil de Resistência: \_\_\_\_\_

CPIS: Data: \_\_\_\_\_

Temperatura: ( ) 0-36,5 – 38,4 ( ) 1 – 38,5-38,9 ( ) 2-  $\geq 39,0$  ou  $\leq 36,0$

Leucócitos: ( ) 0 – 4.000 -11.000 ( ) 1-  $< 4.000$  ou  $> 11.000$  ( ) 2- Bastonetes  $\geq 500$

( ) Desvio a esquerda

Secreção: ( ) 0-  $< 14+$  ( ) 1-  $\geq 14+$  ( ) 2- purulenta - Oxigenação: PaO2 \_\_\_\_ FiO2 \_\_\_\_

Radiografia: ( ) 0 - Sem Infiltrado ( ) 1- Infiltrado difuso ( ) 2- Infiltrado Irregular

Cultura: ( ) 0-  $< 10^6$  ( ) 1-  $> 10^6$  ( ) 2- Gram



## ANEXO II

Paulo Gontijo Filho

De: "Agropoiva Ltda" <agropoiva@terra.com.br>  
 Para: <gontijofilho@ufu.br>  
 Enviada em: segunda-feira, 14 de novembro de 2011, 10:59  
 Anexar: GONTIJO.jpg  
 Assunto: 2ª via boleto  
 Esta é a 2ª via do boleto.



Universidade Federal de Uberlândia  
 Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
 COMITÊ 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 COMITÊ 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 da pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.
- c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução 196/96/CNS, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Data de Entrega de Relatório Final: **dezembro de 2012.**

SITUAÇÃO: PROTOCOLO APROVADO

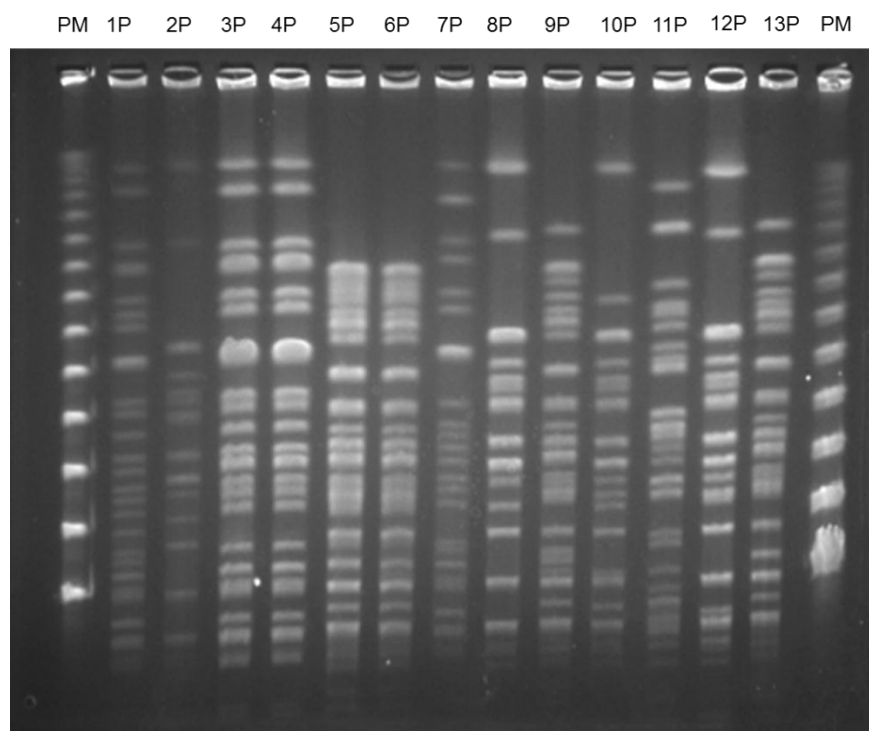
OBS.: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 10 de novembro de 2011.

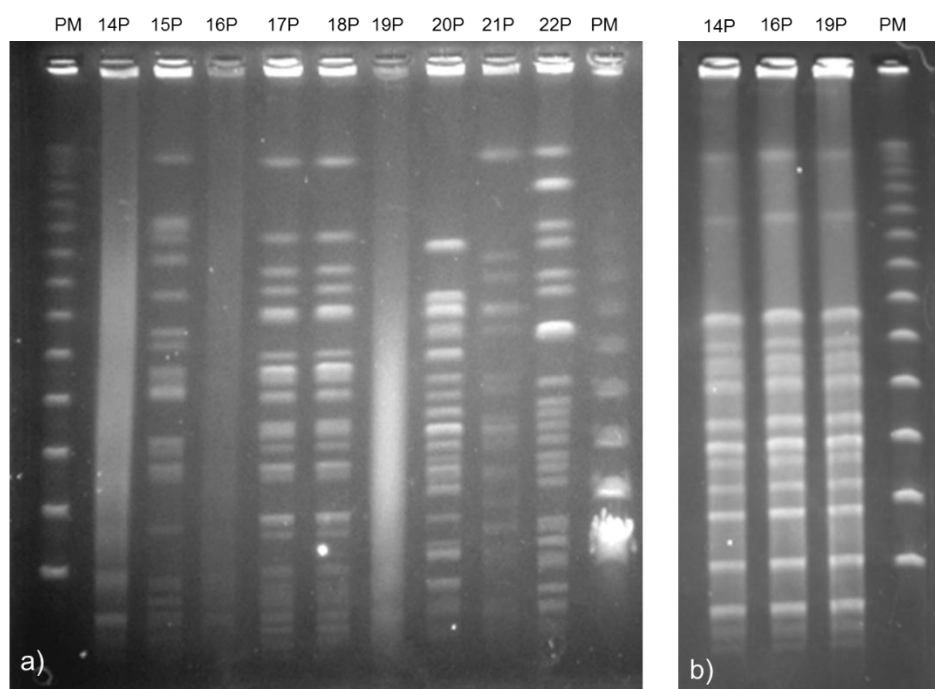
Profa. Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado  
 Coordenadora do CEP/UFU

16/11/2011

### ANEXO III



**Anexo III – Figura 1:** Pulsed Field Gel Electrophoresis. PM: Lambda Ladder PFG Marker; 1P a 13P: amostras de *Pseudomonas aeruginosa*.



**Anexo III – Figura 2:** a e b) Pulsed Field Gel Electrophoresis. PM: Lambda Ladder PFG Marker; 14P a 22P: amostras de *Pseudomonas aeruginosa*. b) Amostras que foram reavaliadas.