

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO MOLECULAR DA RESISTÊNCIA A
CARBAPENÊMICOS E FLUORQUINOLONAS E SUA ASSOCIAÇÃO COM
SISTEMA DE SECREÇÃO TIPO III EM *Pseudomonas aeruginosa***

Melina Lorraine Ferreira

Uberlândia

Agosto - 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO MOLECULAR DA RESISTÊNCIA A
CARBAPENÊMICOS E FLUORQUINOLONAS E SUA ASSOCIAÇÃO COM
SISTEMA DE SECREÇÃO TIPO III EM *Pseudomonas aeruginosa***

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

Melina Lorraine Ferreira

Profa. Dra. Rosineide Marques Ribas (orientadora)

Uberlândia

Agosto – 20

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

F383e Ferreira, Melina Lorraine, 1990-
2014 Estudo epidemiológico molecular da resistência a carbapenêmicos e
fluorquinolonas e sua associação com sistema de secreção tipo III em
Pseudomonas aeruginosa / Melina Lorraine Ferreira. – 2014.
88 p. : il.

Orientadora: Rosineide Marques Ribas.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. *Pseudomonas aeruginosa* - Teses. 3.
Carbapenêmicos - Teses. 4. Epidemiologia - Teses. I. Ribas, Rosineide
Marques, 1974- II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de
Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 612.017



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



Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Melina Lorraine Ferreira

“Estudo epidemiológico molecular da resistência a carbapenêmicos e fluorquinolonas e sua associação com Sistema de Secreção Tipo III em *Pseudomonas aeruginosa*”

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, 29 de agosto de 2014.

Prof. Dra. Natália Iorio Lopes Pontes – UFF

Prof. Dra. Renata Cristina Cezário – UNIPAC

Prof. Dra. Rosineide Marques Ribas (orientadora) – ICBIM/UFU

Dedico este trabalho com muito amor e gratidão aos que sempre estiveram comigo, meus pais Mauro e Nininha, meus irmãos Marcell e Murillo, meus sobrinhos Otávio e Raul e ao meu namorado e amigo Francisco.

“A lei da mente é implacável. O que você pensa, você cria; O que você sente, você atrai;
O que você acredita, torna-se realidade.”

(Buda)

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, fonte de toda sabedoria e amor, por ter guiado meus passos, iluminado meus caminhos e permitido que eu chegasse ao fim de mais uma etapa em minha vida.

Aos meus pais, **Mauro e Nininha**, por todo empenho e dedicação, por me entenderem e estarem comigo em todos os momentos, pelas palavras de incentivo e apoio, pela torcida, orações e por serem sempre o meu porto seguro.

Aos meus irmãos, **Marcell e Murillo**, meus fieis protetores, pelo carinho, cuidado e companheirismo. Aos meus sobrinhos **Otávio e Raul**, pelos momentos maravilhosos de alegria, sorrisos e brincadeiras.

Ao meu namorado **Francisco**, companheiro indispensável nessa etapa, por fazer com que cada obstáculo tivesse um peso mais leve e por fazer meus dias mais felizes.

A todos os meus familiares, em especial meus padrinhos **Pedro e Elci**, primos **Patrícia, Pedro Paulo e Manoel Victor** pelo apoio incondicional.

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

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

Aos meus amigos do Laboratório de Microbiologia Molecular (UFU) e também da vida, **Ana Luiza, Bruna, Daiane, Deivid, Iara, Marcília, Paola, Raquel e Sabrina** e do Laboratório de Virologia (UFU) **Guilherme**, por toda a ajuda, companhia, momentos de diversão, e muito aprendizado.

A todos os queridos amigos, em especial **Thalita, Nathalia, Ana Paula, Eliza, Karine e Mariana**, sempre presentes e que comemoram comigo mais esta vitória.

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

Ao **Prof. Dr. Jonny Yokosawa** do Laboratório de Virologia (UFU), pela disponibilidade e auxílio com as análises do sequenciamento.

As professoras **Dra. Ana Lúcia da Costa Darini** (USP), **Dra. Maria Cristina M. Plotkowski** (UFRJ) e **Dra. Alessandra Saliba** (UFRJ), pela gentileza em ceder as amostras controle PAO1 e PA103 utilizadas neste trabalho.

Aos professores **Prof^a. Dra. Natalia Iorio Lopes Pontes** (UFF), **Prof^a. Dra. Renata Cristina Cezário** (UNIPAC) e **Prof. Dr. Geraldo de Melo** (UFU), por aceitarem participar da minha banca de Mestrado e pelas contribuições que darão ao trabalho.

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

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

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)**, pela concessão de uma bolsa de estudos com a qual foi possível dedicação exclusiva ao mestrado.

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

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	10
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	14
RESUMO	15
ABSTRACT	16
1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS.....	24
2.1. Objetivo Geral	24
2.2 Objetivos específicos.....	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Hospital e Unidade de Terapia Intensiva (UTI)	25
3.2 Desenho do estudo.....	25
3.3 Definições.....	26
3.4 Amostras bacterianas.....	27
3.5 Coleta.....	28
3.6 Identificação das espécies.....	28
3.7 Testes de Sensibilidade aos antimicrobianos.....	29
3.8 Armazenamento das bactérias	29
3.9 Técnicas Moleculares	30
3.9.1 Extração do DNA por lise térmica	30
3.9.2 Caracterização dos genes de Resistência aos carbapenêmicos.....	30
3.9.3 Caracterização dos genes codificadores do Sistema de Secreção Tipo III.....	32
3.9.4 Caracterização dos genes de virulência <i>lasB</i> , <i>algD</i> e <i>toxA</i>	33
3.9.5 Amplificação dos genes da região QRDR (<i>gyrA</i> e <i>parC</i>)	34
3.9.6 Sequenciamento dos fragmentos de DNA amplificados (<i>gyrA</i> e <i>parC</i>)	35
3.9.7 Tipagem molecular pela técnica de Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE)	36
3.10 Análise Estatística	37
3.11 Análise pelo Comitê de Ética	37
4. RESULTADOS.....	38

4.1 População de estudo	38
4.2 Preditores de mortalidade	39
4.3 Distribuição dos genes codificadores de metalo- β -lactamases, TTSS, genes de virulência e taxas de resistência aos antibióticos	45
4.4 Tipagem Molecular.....	48
5. DISCUSSÃO.....	52
6. CONCLUSÕES.....	59
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
ANEXO I.....	80
ANEXO II	81
ANEXO III	82
ANEXO IV	83
ANEXO V	84
ANEXO VI.....	86
ANEXO VII.....	87

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<	Menor
>	Maior
≤	Menor ou igual
≥	Maior ou igual
μg	Microgramas
μL	Microlitros
μM	Micromolar
ASIS	<i>Average Severity of Illness Score</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CBP	Carbapenêmicos
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CPIS	<i>Clinical Pulmonary Infection Score</i>
dNTP	Desoxinucleotídeos
et al.	E colaboradores
FQ	Fluorquinolonas
Glu	Glutamina
HC-UFU	Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia
IC	Intervalo de confiança
ICBIM	Instituto de Ciências Biomédicas

ICC	Índice de Comorbidade de Charlson
Ile	Isoleucina
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
Leu	Leucina
Lys	Lisina
MIC	<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MβL	Metalo-β-lactamase
NHSN	<i>National Healthcare Safety Network</i>
NNIS	<i>National Nosocomial Infections Surveillance</i>
OR	<i>Odds Ratio</i> – Razão de possibilidades
PAV	Pneumonia associada à ventilação mecânica
Pb	<i>base pair</i> , par de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFGE	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>
PM	Padrão de peso molecular
Pmol	Picomol
QRDR	Região Determinante de Resistência a Quinolonas
SENTRY	<i>SENTRY Antimicrobial Surveillance Program</i>
Ser	Serina
ST	<i>Sequence Type</i>
TBE	Tris borato EDTA

TE	Tris, EDTA e água
Thre	Treonina
TSA	<i>Trypticase Soy Agar</i>
TSB	<i>Trypticase Soy Broth</i>
TTSS	<i>Type Three Secretion System</i>
UFC/mL	Unidade Formadora de Colônia / mililitro
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
β	Beta
χ²	Qui-quadrado

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Organograma da população estudada referente a Bacteremia e Pneumonia Associada a Ventilação Mecânica (PAV) causadas por *Pseudomonas aeruginosa*.....38
- Figura 2:** Curva de sobrevivência dos pacientes com bacteremia por *Pseudomonas aeruginosa* que receberam terapia antimicrobiana inapropriada em relação aqueles que receberam terapia antimicrobiana apropriada.....42
- Figura 3:** Dendrograma da análise dos perfis do *Pulsed-field Gel Electrophoresis* (PFGE), linhagens, genótipo e pulsotipo das amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de sangue e aspirado traqueal. Escala representa as porcentagens de similaridade.....50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Linhagens controle utilizadas em cada experimento.....	28
Tabela 2: Primers específicos para detecção dos genes codificadores de metalo- β -lactamases em <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31
Tabela 3: Primers específicos para detecção dos genes codificadores das citotoxinas do Sistema de Secreção Tipo III em <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32
Tabela 4: Primers específicos para detecção dos genes de virulência <i>lasB</i> , <i>algD</i> e <i>toxA</i> , em <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33
Tabela 5: Primers específicos para amplificação e sequenciamento dos genes <i>gyrA</i> e <i>parC</i> , em <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	34
Tabela 6: Fatores de risco associados com mortalidade hospitalar em 30 dias em pacientes com bacteremia por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	40
Tabela 7: Fatores de risco associados com mortalidade hospitalar em 30 dias em pacientes com Pneumonia Associada a Ventilação Mecânica por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	44
Tabela 8: Caracterização das amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistentes aos carbapenêmicos e fluorquinolonas com relação a produção de metalo- β -lactamase, genótipo do Sistema de Secreção Tipo III, perfil de resistência e fatores de virulência.....	47
Tabela 9: Comparação das amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistentes aos carbapenêmicos e fluorquinolonas com relação as mutações de sítio ativo nos genes <i>gyrA</i> e <i>parC</i> de acordo com o genótipo do Sistema de Srecreção Tipo III.....	48
Tabela 10: Perfil fenotípico e genotípico de resistência, sítio e data de isolamento das amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> caracterizadas por Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE).....	51

RESUMO

Introdução: Vem sendo observado a disseminação global de diferentes variantes de *P. aeruginosa* que está frequentemente associada a maior virulência ou a emergência de novos genótipos de resistência aos antimicrobianos. Há poucos estudos descrevendo a associação do Sistema de Secreção Tipo III (TTSS) com resistência aos antibióticos e evolução dos pacientes com pneumonia e bacteremia. **Objetivos:** Determinar a relação entre resistência a fluorquinolonas e carbapenêmicos e a virulência de *Pseudomonas aeruginosa* pelo Sistema de Secreção Tipo III e sua associação com pior prognóstico em pacientes com Pneumonia Associada a Ventilação Mecânica (PAV) e bacteremia, identificar mutações na Região Determinante de Resistência as Quinolonas (QRDR), genes para Metallo- β -Lactamase (M β L), genes de virulência (*algD*, *lasB* e *toxA*) e disseminação clonal das amostras produtoras de M β L. **Material e Métodos:** Foi realizada uma coorte retrospectiva para determinar os fatores de risco para mortalidade em 30 dias em pacientes com primeiro episódio de bacteremia (157 pacientes) e PAV (60 pacientes) por *P. aeruginosa*. Os genes *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SIM}, *bla*_{GIM} e *bla*_{SPM}, os genes do TTSS (*exoT*, *exoS*, *exoY*, *exoU*) e os genes de virulência (*lasB*, *algD*, *toxA*) foram detectados por PCR; o sequenciamento foi realizado para os genes do QRDR (*gyrA* e *parC*) nas cepas resistentes a fluorquinolonas e o *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE) para tipagem molecular das amostras positivas para o gene produtor de M β L. **Resultados:** A análise multivariada mostrou que os preditores independentemente associados com mortalidade nos pacientes com bacteremia foram terapia antimicrobiana inapropriada e câncer. A resistência aos carbapenêmicos foi maior entre as amostras de PAV (53,3%), porém com a detecção dos genes que codificam M β L em apenas um isolado (*bla*_{IMP}), ao contrário do sangue, onde a frequência desses genes foi de 16,1%, sendo 10,7% *bla*_{SPM} e 5,4% *bla*_{VIM}. O gene *exoS* foi encontrado em todas as amostras avaliadas de sangue e pulmão e o gene *exoU* em apenas 9,4% das mesmas. A substituição de uma treonina por isoleucina na posição 83 no gene *gyrA* foi a mais frequente entre as cepas resistentes a fluorquinolonas. Foi detectada uma mutação na posição 91 no gene *parC* (Glu91Lys) associada com a mutação em *gyrA* (Thre83Ile) em uma amostra de *P. aeruginosa*, isolada do pulmão, extensivamente resistente, do genótipo *exoT*⁺*exoS*⁺*exoU*⁺, ainda não descrita no Brasil. Entre as amostras que carregavam os genes de virulência TTSS observou-se alta resistência a gentamicina (93,7%) e baixa para amicacina (37,5%). A avaliação da relação clonal entre as amostras contendo os genes *bla*_{SPM}, *bla*_{VIM} e *bla*_{IMP}, apresentou alta similaridade (maior que 80%), naquelas contendo *bla*_{SPM}, o que não foi observado para as amostras contendo o gene *bla*_{VIM}. **Conclusões:** Nossos resultados confirmam achados prévios com relação a disseminação do clone *bla*_{SPM}, com evidências indiretas da sua disseminação cruzada no nosso hospital e policlonal daquelas contendo o gene *bla*_{VIM}. A terapia inapropriada é fator significativo para pior prognóstico entre os pacientes com bacteremia por *P. aeruginosa* multirresistente, independente do genótipo de virulência TTSS associado.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*, TTSS, resistência a carbapenêmicos, resistência a fluorquinolonas

ABSTRACT

Introduction: Has been observed the global spread of different variants of *P. aeruginosa* that is often associated with increased virulence or the emergence of new antimicrobial resistance genotypes. There are few studies describing the association of the Type III Secretion System (TTSS) with antibiotic resistance and outcome of patients with pneumonia and bacteremia. **Objectives:** Determine the relation among resistance to carbapenems and fluoroquinolones and the Type III Secretion System (TTSS) effector genotype and its association with the poor prognostic in patients with ventilator-associated pneumonia (VAP) and bacteremia, identify mutations in the Quinolone Resistance Determining Regions (QRDRs), Metallo- β -Lactamase genes (M β L), virulence genes (*algD*, *lasB* e *toxA*) and clonal spread of isolates producing M β L. **Material and Methods:** A retrospective cohort was conducted to determine the risk factors for 30-day mortality in patients with the first episode of bacteremia (157 patients) and VAP (60 patients) caused by *P. aeruginosa*. Genes *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SIM}, *bla*_{GIM} and *bla*_{SPM}, TTSS genes (*exoT*, *exoS*, *exoY*, *exoU*) and virulence genes (*lasB*, *algD*, *toxA*) were detected by PCR; the sequencing was conducted for QRDR genes (*gyrA* e *parC*) on fluoroquinolone-resistant strains and the Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) for molecular typing of positive strains for the M β L genes. **Results:** The multivariate analysis showed that predictors independently associated with death in patients with bacteremia were inappropriate therapy and cancer. Carbapenem resistance was more frequent among strains of VAP (53.3%), however with the detection of M β L genes in one isolate (*bla*_{IMP}), unlike blood, where the frequency of these genes was 16.1%, being 10.7% *bla*_{SPM} genotype and 5.4% *bla*_{VIM} genotype. The *exoS* gene was found in all blood and lung isolates and the *exoU* gene only in 9.4%. Substitution of threonine to isoleucine at position 83 in *gyrA* was the most frequent mutation among fluoroquinolone-resistant strains. It was detected a mutation at position 91 in *parC* gene (Glu91Lys) associated with mutation in *gyrA* (Thre83Ile) in a strain of extensively drug-resistant *P. aeruginosa*, *exoT*⁺*exoS*⁺*exoU*⁺ genotype, isolate from lung, not described in Brazil yet. Among the strains that harboring the TTSS virulence genes it was observed high resistance to gentamicin (93.7%) and low for amikacin (37.5%). The evaluation of the clonal relationship between isolates producing *bla*_{SPM}, *bla*_{VIM} and *bla*_{IMP} genes showed similarity (more than 80%) among the *bla*_{SPM} strains, which was not observed for those producing *bla*_{VIM} gene. **Conclusions:** Our results confirm previous findings regarding the spread of *bla*_{SPM} clone, with indirect evidence of its cross-spread in our hospital and polyclonal those containing the *bla*_{VIM} gene. Inappropriate therapy is significant factor for poor prognosis among patients with bacteremia caused by multidrug-resistant *P. aeruginosa*, independent of the virulence TTSS genotype associated.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, TTSS, carbapenem-resistance, fluoroquinolone-resistance

1. INTRODUÇÃO

A detecção de patógenos considerados epidemiologicamente importantes como *Pseudomonas aeruginosa* circulantes em determinado ambiente ou comunidade e o conhecimento de suas características tanto epidemiológicas quanto moleculares são de fundamental importância no desenvolvimento de estratégias de tratamento, prevenção e controle de infecções além de contribuir para previsão de surtos antes do seu estabelecimento.

Infecções graves Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), como bacteremia e Pneumonia Associada a Ventilação Mecânica (PAV) causadas por *P. aeruginosa* resistentes aos antimicrobianos resultam no aumento das taxas de morbidade e mortalidade, além de hospitalização prolongada e custos maiores quando comparadas àquelas causadas por cepas sensíveis (KANG et al., 2005; HIRSC; TAM, 2010; MORALES et al., 2012). Aspectos relacionados com a epidemiologia e evolução dos pacientes com essas infecções podem ser alterados em função dos altos níveis de resistência que o microrganismo apresenta e, como consequências surgem as dificuldades relacionadas ao tratamento (KANG et al., 2003; LODISE et al., 2007). O estudo de infecções graves por *P. aeruginosa* deve ser considerado, principalmente em países como o Brasil, onde é notória a escassez de dados e o problema é agravado em função da falta de recursos humanos e financeiros, inexistência de laboratórios e de prática usual na terapêutica antimicrobiana empírica (TOUFEN JUNIOR et al., 2003; KOLLEF, 2005).

A Infecção de Corrente Sanguínea está entre as complicações infecciosas mais frequentes e graves decorrente de hospitalização e cuidados médicos (MITT et al., 2009). A importância e a frequência dessas infecções, sua epidemiologia e os microrganismos tem mudado em paralelo com a evolução da medicina, particularmente com a emergência de uma grande população de pacientes imunocomprometidos e que frequentemente dependem de procedimentos invasivos e ou suportes médicos, sendo que a maioria dessas infecções são adquiridas no hospital em taxas que variam de 1 a 36% em diferentes estudos (COLLIN et al., 2001; WARREN et al., 2001; MARRA et al., 2011). As bacteremias primárias são em sua maioria (cerca de 87%), relacionadas ao uso de cateter venoso central (CVC) (VINCENT, 2003). No Brasil estudos recentes

mostraram taxas de incidência de bacteremia de 12,22 por 1000 CVC/dia (BICUDO et al., 2011).

A presença de bactéria na corrente sanguínea é de grande importância clínica, demonstrando que o hospedeiro não pôde controlar a infecção a partir de um foco primário ou não está recebendo terapia empírica antimicrobiana apropriada. Sendo assim, a identificação de *P. aeruginosa* na corrente sanguínea, geralmente é um indicador de disseminação de infecção, além de um marcador de prognóstico ruim (SHORR et al., 2006). O estudo de Wisplinghff e colaboradores (2004) realizado em 49 hospitais dos Estados Unidos durante um período de sete anos, detectou 24.179 casos de infecção de corrente sanguínea hospitalar e embora a *P. aeruginosa* tenha sido o sétimo isolado mais frequente, este microrganismo liderou as taxas de mortalidade em relação ao total de pacientes internados (38,7%), sendo 47,9% internados nas Unidades de Terapia Intensiva (UTI) e 27,6% em outras enfermarias.

Já a PAV refere-se à pneumonia desenvolvida após 48 horas de entubação endotraqueal e ventilação mecânica (DAVIS, 2006; BONTEN, 2011). Com a presença da ventilação mecânica os mecanismos de defesa como a tosse e a barreira muco-ciliar ficam comprometidas (APPELGREN et al., 2001; TEJADA et al., 2001; JOSEPH et al., 2010), favorecendo a microaspiração de secreções da orofaringe colonizadas por microrganismos potencialmente patogênicos como a *P. aeruginosa* (VINCENT, 2003; BERGMANS; BONTEN, 2004; SAFDAR; CRNICH; MAKI, 2005).

Entre as infecções hospitalares, a pneumonia é a segunda mais comum e a primeira em pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI), onde representam cerca de 50% das infecções (VINCENT, 2003; ALP et al., 2004). Elas ocorrem em 9-24% dos pacientes em uso de ventilação mecânica, elevam o tempo de internação e contribuem para aumentar a taxa de mortalidade nas UTIs (PELEG; HOOPER, 2010; AL-DORZI et al., 2012; TSENG et al., 2012). Nos países desenvolvidos a taxa de incidência de PAV varia de 1 a 4 casos por 1000 dias de ventilação (TAO et al., 2012) e sua incidência é de 13 casos por 1000 dias de ventilação nos países em desenvolvimento (ROSENTHAL et al., 2010; TAO et al., 2012), sendo que na UTI de adultos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFGO) a taxa de incidência de PAV foi de 24,59 casos por 1000 dias de ventilação,

portando superior a outras taxas descritas em países em desenvolvimento (ROCHA et al., 2008).

P. aeruginosa tem sido uma grande ameaça nos últimos anos para a população hospitalizada com infecções graves e especialmente para indivíduos com comprometimento do sistema imunológico e a importância clínica desse microrganismo está associada com sua erradicação difícil e contínuos fracassos terapêuticos, uma vez que as opções para o tratamento nas infecções causadas por esse microrganismo são limitadas pela alta incidência de cepas multirresistentes e panresistentes (LEIBOVICI et al., 1998; MESAROS et al., 2007).

Atualmente, o aumento da incidência de *P. aeruginosa* multirresistente é um problema global, consequência da habilidade desse microrganismo em desenvolver resistência a quase todos antimicrobianos disponíveis para tratamento, quer seja pela seleção de mutações em genes cromossômicos ou pela transferência horizontal de genes (ZAVASCKI et al., 2005; XAVIER et al., 2010). No Brasil, esse problema é ainda mais significativo, uma vez que existe uma alta densidade de uso de antibióticos, principalmente β -lactâmicos, incluindo carbapenêmicos, e fluorquinolonas (MOREIRA et al., 2013; PORTO et al., 2013). A resistência em *P. aeruginosa* aos carbapenêmicos é superior a 60% nos hospitais brasileiros (KIFFER et al., 2005; BAUMGART et al., 2010) e ocorre principalmente pela produção de metalo- β -lactamases, além do aparecimento de outras β -lactamases com atividade de carbapenemase entre as amostras clínicas, incluindo KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*) e OXA-carbapenemase (GALES et al., 2003; QUALE et al., 2006; CEZARIO et al., 2009; SCHEFFER et al., 2010).

Além da emergência e disseminação destas enzimas, a resistência a carbapenêmicos pode estar relacionada a outros mecanismos tais como: perda de porinas de membrana externa (OprD); hiperexpressão de bombas de efluxo em combinação com a hiperprodução de AmpC cromossomal induzível (WALTHER-RASMUSSEN; HOIBY, 2007). Estes mecanismos podem ser expressos isoladamente ou combinados e desempenham papel importante na resistência múltipla aos antimicrobianos aumentando, conseqüentemente, a probabilidade de ocorrer terapia antimicrobiana inapropriada (JACOBY; MUNHOZ-PRICE et al., 2005).

Nos últimos anos a produção de metalo- β -lactamase por *P. aeruginosa* com capacidade de hidrolisar todos os β -lactâmicos, com exceção dos monobactâmicos (aztreonam), assumiu grande importância epidemiológica estando associada 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*) (SEKIGUCHI 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), essa última isolada primeiramente em uma amostra urinária de *P. aeruginosa* em São Paulo (TOLEMAN et al., 2002) porém já descrita em várias outras regiões incluindo Paraná, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Pernambuco, Maranhão e Minas Gerais (GALES et al., 2003; CIPRIANO et al., 2007; GASPARETO et al., 2007). Um estudo realizado em um hospital universitário de São Paulo por Xavier e colaboradores (2010) detectou os genes *bla*_{SPM-1} e *bla*_{IMP-1} em 14 (23,7%) e 1 (1,7%) dos isolados, respectivamente. Dentre as 14 *P. aeruginosa* produtoras de SPM, 13 demonstraram o mesmo perfil clonal, evidenciando a presença de transmissão cruzada do gene de resistência. Sader e colaboradores (2004) e Zavascki e colaboradores (2005) revelaram taxas de resistência preocupantes ao imipenem (49,0% e 59,0%) e ceftazidima (40,5% e 49,0%), relacionadas com a presença de *P. aeruginosa* produtora de metalo- β -lactamase da família SPM obtidas de isolados em hospitais de diferentes regiões do Brasil. No Sul do país a enzima SPM-1 foi detectada em 19,6% dos isolados de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem ou ceftazidima (MARTINS et al., 2007). Enquanto a subclasse SPM-1 é relatada no Brasil e Europa (SALABI et al., 2010), outros países na América do Sul como Argentina, Venezuela, Chile e Colômbia descrevem a presença de VIM-2, VIM-8 e VIM-11 em isolados de *P. aeruginosa* (QUEENAN; BUSH, 2007).

Com relação a resistência de *P. aeruginosa* a fluorquinolonas, vários mecanismos diferentes estão envolvidos, incluindo mecanismos mediados por genes cromossômicos como: alterações de sítios ativos de quinolonas (topoisomerase IV e DNA girase), diminuição do acúmulo de antibióticos no interior da célula e

hiperexpressão do sistema de bomba de efluxo (POOLE, 2000; JACOBY, 2005; BREIDENSTEIN et al., 2011). Os mecanismos plasmidiais responsáveis por esse fenótipo têm sido descritos na literatura principalmente para bactérias gram-negativas da família Enterobacteriaceae (COBAN et al., 2012; PALTANSING et al., 2012), e em *Pseudomonas aeruginosa* esses mecanismos estão sendo investigados com poucos relatos descritos (COBAN et al., 2011).

Em bactérias Gram-negativas as quinolonas agem preferencialmente na DNA girase enquanto em Gram-positivas o alvo principal é a enzima Topoisomerase IV (RUIZ, 2003). Em *P. aeruginosa* a resistência a fluorquinolonas ocorre principalmente por mecanismos intrínsecos ocorrendo mutações de genes alvos que codificam enzimas essenciais para manutenção do genoma (DNA girase e topoisomerase IV) (MOUNEIMNÉ et al., 1999; HIGGINS et al., 2003). Essas enzimas são codificadas por duas subunidades compostas pelos genes *gyrA*, *gyrB* e *parC* e *parE*, respectivamente. DNA girase é responsável pela catalização do “*supercoiling*” (super helicoidização) negativo do DNA e a topoisomerase IV promove a separação do DNA circular resultante da duplicação do DNA bacteriano (decatenação). Essas funções são essenciais para o sucesso da replicação do genoma da bactéria (AGNELLO; WONG-BERINGER, 2012). As fluorquinolonas se ligam a essas enzimas e previnem que essas reações se completem. Mutações nos quatro genes alvo que conferem resistência às quinolonas têm sido bem descritos em *P. aeruginosa* (JALAL et al., 2000; LEE et al., 2005).

As mutações descritas no gene *gyrA* geralmente estão localizadas na posição dos nucleotídeos de 115 a 135 pares de bases em uma área determinante de resistência a quinolonas (QRDR). Mutações no gene *gyrB* especialmente entre as posições 1170 a 1895, conferem resistência as quinolonas (LEE et al., 2005), entretanto alterações nesse gene são menos frequentes quando comparadas aquelas no *gyrA* (AGNELLO; WONG-BERINGER, 2012). A resistência a fluorquinolonas associada com mutações em *parC* são mais comuns que em *parE*, entretanto há necessidade de alterações de DNA girase concomitantemente demonstrando um papel secundário da topoisomerase IV nesse fenótipo (BREINES et al., 1997).

Dados da literatura demonstram que o Brasil apresenta uma das mais altas taxas de resistência a fluorquinolonas entre os países da América Latina. De acordo com

estudos realizados pelo “SENTRY *Antimicrobial Surveillance Program*” analisando dados referentes ao perfil de sensibilidade de isolados provenientes de países da América Latina entre os anos de 1997 a 2001, a resistência de *P. aeruginosa* a fluorquinolonas foi de 50,1% (SADER et al., 2004). Em estudos prévios realizados pela nossa equipe a presença de *P. aeruginosa* resistente a fluorquinolonas na UTI de adultos foi muito alta (76,1%), refletindo o intenso uso de antimicrobianos da unidade (CARVALHO; GONTIJO-FILHO, 2008). Esses dados foram significativamente maiores do que aqueles publicados pelos programas ICARE (35%) (NNIS, 2004) e SARI (18%) (MEYER et al., 2003).

Além da multirresistência aos antibióticos, *P. aeruginosa* expressa vários determinantes de virulência, mas o Sistema de Secreção Tipo III (TTSS) tem sido implicado como fator importante na patogênese de infecções graves por esse microrganismo. Esse sistema permite que a bactéria introduza citotoxinas (ExoS, ExoU, ExoY e ExoT) na célula do hospedeiro fazendo com que a bactéria consiga evadir das defesas do sistema imune. Essa evasão se dá pela prevenção da fagocitose através da modulação no citoesqueleto de actina na célula do hospedeiro, inibindo a síntese de DNA a levando a morte celular (GALAN; COLLMER, 1999; SATO; FRANK, 2004).

Adicionalmente outros genes de virulência podem contribuir para a patogenicidade de infecções graves (TODAR, 2004). Entre os principais fatores de virulência já descritos na literatura, destacam-se aqueles relacionados com a adesão dos microrganismos à célula hospedeira como flagelo, fímbrias e alginato (KIPNIS, 2006) e aqueles que facilitam o rompimento da integridade epitelial e interferem no sistema imune, como elastase, fosfolipase C, protease alcalina, entre outros (JAFFAR-BANDJEE et al., 1995) além de exotoxina A, piocianina e pioverdina.

Estudos prévios sugerem que amostras de *P. aeruginosa* resistentes a antibióticos podem estar associados com aumento na virulência desses microrganismos e que cepas de *P. aeruginosa* resistentes a fluorquinolonas são relacionadas a taxas três vezes maiores de mortalidade e doença crônica comparadas com aquelas infecções por cepas susceptíveis (HSU et al., 2005) e a resistência associada a expressão de virulência TTSS (especialmente ExoU) estão associadas independentemente com piores prognósticos em pacientes infectados por *P. aeruginosa* (ROY-BURMAN et al., 2001; HAUSER et al., 2002; HSU et al., 2005). Outros estudos relataram que 25 a 30% dos

isolados de *P. aeruginosa* de origem respiratória carregavam o gene *exoU* (FELTMAN et al., 2001; ROY-BURMAN et al., 2001) enquanto a maioria das amostras clínicas carregando *exoS* foram encontrados naquelas cepas resistentes a fluorquinolonas (WONG-BERINGER et al., 2007).

Nos últimos anos, vem sendo observado na literatura a disseminação global de diferentes variantes endêmicas e epidêmicas de *P. aeruginosa* e essa disseminação está frequentemente associada a maior virulência (o que confere vantagem adaptativa aos microrganismos) ou a emergência de novos genótipos de resistência as drogas antimicrobianas e como consequência há um aumento da morbidade, mortalidade e custos associados (LIVERMORE, 2002; HOCQUET et al., 2003; CABOT et al., 2012)

Apesar de estudos no Brasil descreverem a disseminação de clones predominantes em diversos hospitais em regiões diferentes (GALES et al., 2003; CEZÁRIO et al., 2009; GALETTI et al., 2010) ainda existem poucos dados quanto a incidência de *P. aeruginosa* resistentes a fluorquinolonas e carbapenêmicos e clones associados na nossa região e tão pouco, estudos descrevendo associação do TTSS com a evolução dos pacientes com pneumonia e bacteremia por esse microrganismo. O método de Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE) tem sido amplamente utilizado para classificação dos isolados em linhagens clonais e descrito em diversos estudos de epidemiologia molecular, considerando o seu alto poder discriminatório, tipabilidade e reprodutibilidade (ALLOUSH et al., 2006; GALETTI et al., 2010).

Em decorrência de *P. aeruginosa* multirresistente isoladas de pacientes com infecções graves internados no hospital de grande porte, nós propusemos um estudo complexo sobre a resistência desse microrganismo a carbapenêmicos e fluorquinolonas, bem como sua relação com a mortalidade e fatores de virulência incluindo o Sistema de Secreção do Tipo III a partir de amostras recuperadas de sangue e secreção traqueal. Pretendemos, dessa maneira, gerar conhecimentos que possam auxiliar no controle e disseminação desse microrganismo no nosso hospital.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Determinar a relação entre resistência a fluorquinolonas e carbapenêmicos e a virulência de *Pseudomonas aeruginosa* pelo Sistema de Secreção Tipo III e sua associação com pior prognóstico em pacientes com PAV e bacteremia.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a emergência e disseminação de clones de *Pseudomonas aeruginosa* produtores de metalo- β -lactamases em diferentes clínicas do HC-UFU.
- Avaliar a presença de mutações no QRDR dos genes cromossômicos *gyrA* e *parC* e o perfil de susceptibilidade a fluorquinolonas.
- Determinar os genes responsáveis por codificarem as metalo- β -lactamases (*bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, *bla_{SIM}*, *bla_{GIM}* e *bla_{SPM}*).
- Determinar a frequência dos genes codificadores das exotoxinas do Sistema de Secreção Tipo III (*exoS*, *exoT*, *exoU* e *exoY*) e dos fatores de virulência (*toxA*, *algD* e *lasB*) nas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos e fluorquinolonas.
- Determinar o perfil de sensibilidade a diferentes antibióticos e a relação da antibioticoterapia com a evolução clínica

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Hospital e Unidade de Terapia Intensiva (UTI)

O Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU) é um complexo hospitalar público, universitário, de assistência terciária e com capacidade para 530 leitos e apresenta uma Unidade de Terapia Intensiva de Adultos mista, com um total de 30 leitos. É referência para uma população estimada de mais de dois milhões de habitantes, moradores de Uberlândia e de 81 municípios das regiões do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba. Nos últimos anos, tem sido responsável por praticamente todo o atendimento hospitalar vinculado ao Sistema Único de Saúde (SUS) do município de Uberlândia. Possui clínicas de várias especialidades e, por ser um hospital de alta complexidade que atua como referência regional, grande parte dos seus pacientes exige cuidados complexos.

3.2 Desenho do estudo

Foi realizado um estudo observacional prospectivo através de vigilância ativa na UTI de adultos (detecção de pacientes com PAV) e Laboratório de Microbiologia do HC-UFU (detecção de pacientes com bacteremia), no período de março de 2011 a novembro de 2012, e maio de 2009 a dezembro de 2012, respectivamente. Foram incluídos apenas o primeiro episódio de PAV e bacteremia por *P. aeruginosa*. Foi conduzido um estudo de coorte entre os pacientes com infecção para detecção dos fatores de risco associados com a mortalidade em 30 dias e o impacto da terapia inadequada na evolução dos pacientes com bacteremia e PAV. As características demográficas, clínicas e epidemiológicas dos pacientes foram obtidas através da revisão de prontuários médicos utilizando uma ficha individual, seguindo o modelo do NHSN (*National Healthcare Safety Network*) (ANEXO I).

3.3 Definições

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

Bacteremia: de acordo com o CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*), bacteremia é definida como a presença de bactérias na corrente sanguínea comprovadas laboratorialmente através de cultura positiva. A bacteremia é classificada como primária quando não é relatado outro foco da infecção ou quando é relacionada ao CVC, e secundária quando clinicamente relacionada a outro sítio anatômico de infecção, como pulmão, trato urinário, infecção de sítio cirúrgico e outros (CDC, 2002; BAUMGART et al., 2010).

Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica (PAV): os pacientes com PAV foram aqueles que estavam sob ventilação mecânica por período ≥ 48 horas que apresentaram desenvolvimento de infiltrado radiológico novo e/ou progressivo e pelo menos dois dos seguintes critérios clínicos/laboratoriais: secreção respiratória purulenta, temperatura maior que $38,5^{\circ}\text{C}$ ou menor que 35°C , contagem de leucócitos maior que $10000/\mu\text{l}$ com desvio a esquerda ou menor que $3000/\mu\text{l}$ e cultura quantitativa de aspirado traqueal com contagem $\geq 10^6$ UFC/mL (ALP; VOSS, 2006; XIE et al., 2011). As PAVs precoces ocorrem em até 4 dias após o início do uso da prótese ventilatória e as tardias após esse período (HUNTER, 2006; RELLO et al., 2006;).

Clinical Pulmonary Infection Score (CPIS): O CPIS foi determinado para todos pacientes com suspeita de PAV por *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 (ZILBERBERG; SHORR, 2010), considerando-se como ponto de corte contagem ≥ 6 (ANEXO II).

Índice de Comorbidade de Charlson (ICC): foi calculado para os pacientes com diagnóstico de PAV para avaliar os efeitos das comorbidades sobre o prognóstico,

sendo calculado com base em uma pontuação que varia de 1 a 6 (NEEDHAM et al., 2005).

Average Severity of Illness Score (ASIS): foi calculado para os pacientes com bacteremia para avaliar a gravidade clínica de cada paciente, os pontos são atribuídos de forma proporcional a gravidade observada (ROSENTHAL et al., 2006).

Multiresistência: foi definida como a resistência a pelo menos um agente em 3 ou mais categorias de antimicrobianos (MAGIORAKOS et al., 2012).

Cepa Extensivamente Resistente: resistência a pelo menos um agente em todas as categorias de antimicrobianos, podendo ser excluída até duas categorias (MAGIORAKOS et al., 2012)

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

Mortalidade hospitalar (30 dias): foi considerado o número de óbitos dos pacientes com bacteremia e PAV durante a hospitalização, que ocorreram até 30 dias após o diagnóstico de infecção (LODISE et al., 2007).

3.4 Amostras bacterianas

Foram avaliadas amostras de *P. aeruginosa* isoladas de material clínico (aspirado traqueal e sangue) recuperadas junto ao Laboratório de Microbiologia do HC-UFU. As amostras foram cultivadas e estocadas a -20°C para posteriores avaliações microbiológicas e moleculares no Laboratório de Microbiologia Molecular (ICBIM-UFU). As amostras controle que foram utilizadas nos experimentos estão descritas na tabela 1.

Tabela 1. Linhagens controle utilizadas em cada experimento

Linhagem controle	Experimento
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	Controle positivo para <i>P. aeruginosa</i>
PAO1(<i>exoS</i> +/ <i>exoT</i> +/ <i>exoY</i> +)	PCR simplex para os genes <i>exoS</i> e <i>exoY</i>
PAO1 ou PA103	PCR simplex para o gene <i>exoT</i>
PA103 (<i>exoU</i> +/ <i>exoT</i> +/ <i>exoY</i> +)	PCR simplex para o gene <i>exoU</i>
PAO1 (<i>GyrA</i> / <i>ParC</i>)	PCR simplex para genes <i>gyrA</i> e <i>parC</i>
PAO1	Sequenciamento gênico <i>gyrA</i> e <i>parC</i>
<i>P. aeruginosa</i> 101-4704	PCR para o gene <i>bla</i> _{IMP}
<i>P. aeruginosa</i> A1254	PCR para o gene <i>bla</i> _{VIM}
<i>A. baumannii</i> YMC03/9/T104	PCR para o gene <i>bla</i> _{SIM}
<i>P. aeruginosa</i> 75-5671	PCR para o gene <i>bla</i> _{GIM}
<i>P. aeruginosa</i> 48-1997 ^a	PCR para o gene <i>bla</i> _{SPM}
PAO1	PCR multiplex para os genes <i>lasB</i> , <i>algD</i> e <i>toxA</i>

3.5 Coleta

O aspirado traqueal foi coletado de pacientes em uso de prótese ventilatória com suspeita de pneumonia durante a toaleta 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 do HC-UFU.

As hemoculturas foram coletadas por punção periférica pelos profissionais do setor de coleta do hospital e a cultura foi realizada no Laboratório de Microbiologia do HC-UFU utilizando o sistema automatizado *BacT/ALERT*® (BioMérieux).

3.6 Identificação das espécies

A identificação dos microrganismos e a suscetibilidade antimicrobiana foi realizada utilizando-se o sistema automatizado VITEK®2 (bioMérieux) no Laboratório de Microbiologia do HC-UFU. As amostras bacterianas foram suspensas em solução salina 0,45% para obter uma suspensão com turbidez compatível com a escala de 0,50 a 0,63 de McFarland utilizando um turbidímetro. Em seguida, os cartões foram inseridos no aparelho e cada teste bioquímico foi preenchido, selado e incubado automaticamente.

Durante o período de incubação (7-10 horas) os cartões foram lidos a cada 15 minutos através de um sistema óptico de transmitância usando diferentes comprimentos de onda no espectro visível. Os resultados foram analisados pelo *software* do aparelho através de algoritmos e reportados automaticamente.

3.7 Testes de Sensibilidade aos antimicrobianos

As amostras bacterianas 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. Esses dados são usados para gerar uma curva de crescimento e, por comparação com um controle, o MIC (do inglês, “*Minimum Inhibitory Concentration*”) de cada antibiótico é estimado. Esse cálculo é realizado com um algoritmo específico para cada antimicrobiano independente da espécie do microrganismo.

3.8 Armazenamento das bactérias

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 cultivadas em “Tryptic Soy Agar” (TSA) pela técnica de esgotamento para obtenção de cultura pura e, posteriormente, armazenadas em tubos criogênicos contendo caldo “Brain Heart Infusion” (BHI) acrescido de 15% de glicerol, seguindo-se incubação a 37°C por 24 horas. A suspensão resultante foi estocada a temperatura de -20°C (KONEMAN et al., 2001).

3.9 Técnicas Moleculares

3.9.1 Extração do DNA por lise térmica

Para a extração do DNA genômico dos isolados de *P. aeruginosa*, as amostras foram cultivadas em ágar MacConkey por 18-24 horas. Foram selecionadas colônias puras isoladas que foram ressuspensas em 1mL de tampão TE (1X) em tubos de 1,5 mL. Os tubos foram centrifugados a 12000xg por 2 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet de bactérias ressuspensas em 1mL de tampão TE, os tubos foram novamente centrifugados a 12000xg por 2 minutos, sobrenadante descartado e o pellet ressuspensas em 1mL de tampão TE.

Os tubos foram então fervidos por 10 minutos em banho maria ou termobloco, novamente centrifugados a 12000xg por 2 minutos. Foi recuperado 500µL do sobrenadante com DNA.

O DNA extraído foi quantificado por espectrofotometria (Nanodrop®) utilizando um tubo de tampão TE como branco. Após feita a leitura o DNA extraído foi armazenado a -20°C no freezer até o momento da utilização.

3.9.2 Caracterização dos genes de Resistência aos carbapenêmicos (WOODFORD et al., 2010)

Para investigar a presença dos genes relacionados a resistência aos carbapenêmicos produtores de metalo-β-lactamase, foi realizada as ampliações desses genes pela técnica de PCR multiplex com os primers específicos para os genes *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, *bla_{SIM}*, *bla_{GIM}* e *bla_{SPM}*, como descritos na tabela 2.

Tabela 2. Primers específicos para detecção dos genes codificadores de metalo- β - lactamases em *Pseudomonas aeruginosa*

Gene	Seqüência (5' - 3')	Produto amplificado (pb)	Referência
<i>blaIMP</i>	F: GAATAGRRTGGCTTAAYTCTC R: CCAAACYACTASGTTATC	188	WOODFORD et al., 2010
<i>blaVIM</i>	F: GTTTGGTCGCATATCGCAAC R: AATGCGCAGCACCAGGATAG	382	WOODFORD et al., 2010
<i>blaGIM</i>	F: TCAATTAGCTCTTGGGCTGAC R: CGGAACGACCATTGGAATGG	72	WOODFORD et al., 2010
<i>blaSIM</i>	F: GTACAAGGGATTTCGGCATCG R: TGGCCTGTTCCCATGTGAG	569	WOODFORD et al., 2010
<i>blaSPM</i>	F: CTAAATCGAGAGCCCTGCTTG R: CCTTTTCCGCGACCTTGATC	798	WOODFORD et al., 2010

Para a amplificação dos genes de resistência foi utilizado 1 μ L da suspensão de DNA extraído conforme descrito anteriormente. A reação foi preparada para um volume final de 25 μ L utilizando os seguintes reagentes: água ultra pura autoclavada, solução tampão da Taq [10 x] diluído para uma concentração final de [1 x], 0,05 U de Taq DNA polimerase com $MgCl_2$ (Promega Corporation), os quatro desoxirribonucleotídeos (dNTPs) na concentração de 0,2 mM (Promega Corporation) e 0,5 μ M dos *primers* específicos na tabela 2.

A amplificação foi realizada no *Eppendorf Mastercycler* e as condições da reação de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, 30 ciclos com desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 53°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos, e extensão final a 72°C por 10 minutos.

A análise dos produtos da reação foi realizada utilizando-se 5 μ L dos produtos amplificados, transferindo-os para um gel de agarose a 1,5% preparado com tampão TBE [0,5x] e 1 μ L de SYBR® Safe (Invitrogen) a cada 20 mL de gel. O marcador de peso molecular utilizado foi 100 pb DNA Ladder (BioAmerica Inc).

A eletroforese correu a 90V por cerca de 90 minutos, e o gel foi fotografado utilizando o sistema de fotodocumentação L-Pix EX (Loccus Biotecnologia).

3.9.3 Caracterização dos genes codificadores do Sistema de Secreção Tipo III (JABALAMELI et al., 2012)

A detecção dos genes codificadores do Sistema de Secreção Tipo III, *exoS*, *exoY*, *exoT* e *exoU* foi realizada utilizando a técnica de PCR simplex. Os primers utilizados nas reações estão descritos na tabela 3 e correspondem a regiões específicas dos genes codificadores das citotoxinas.

Tabela 3. Primers específicos para detecção dos genes codificadores das citotoxinas do Sistema de Secreção Tipo III em *Pseudomonas aeruginosa*

Gene	Seqüência (5'- 3')	Produto amplificado (pb)	Referência
<i>exoS</i>	F: TCAGGTACCCGGCATTCACTACGCGG R: TCACTGCAGGTTCGTGACGTCTTTCTTTA	572	FELTMAN et al., 2001
<i>exoY</i>	F: TCCAAGCTTATGCGTATCGACGGTCATC R: CGTATCGATCCGAGGGGGGTGTATCTGACC	730	
<i>exoT</i>	F: AGAACCCGTCTTTCGTGGCTGAGTT R: CAGCTCGCTCGCCTTGCCAAGT	351	JABALAMELI et al., 2012
<i>exoU</i>	F: CCTTAGCCATCTCAACGGTAGTC R: GAGGGCGAAGCTGGGGAGGTA	911	

Para a amplificação dos genes codificadores das citotoxinas *exoT* e *exoS* foi utilizado 5 µL da suspensão da bactéria-teste (DNA extraído) e para os genes *exoY* e *exoU* foi utilizada uma pequena parte da colônia bacteriana diretamente na reação. A reação foi preparada para um volume final de 25µL. Em cada tubo foi adicionado água ultra pura autoclavada, tampão da Taq [10 x] diluído para uma concentração final de [1 x], 1,5 U de Taq DNA polimerase com MgCl₂, 0,2 mM do Mix de dNTPs, 0,5µM de cada primer descrito na tabela 3.

As condições da reação de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos, 40 ciclos com desnaturação a 94°C por 40 segundos, anelamento a 55°C (para *exoS* e *exoY*), 64°C (para *exoU*) e 65,5°C (para *exoT*) por 30 segundos, extensão a 72°C por 60 segundos, e extensão final a 72°C por 5 minutos.

A análise dos produtos da reação, eletroforese e documentação do gel foram realizadas como descrito no item 3.9.2.

3.9.4 Caracterização dos genes de virulência *lasB*, *algD* e *toxA* (LANNOTE et al., 2004)

Para investigar a presença dos genes relacionados a virulência das amostras de *P. aeruginosa*, foi realizada a amplificação desses genes pela técnica de PCR simplex com os primers específicos para os genes *lasB*, *algD* e *toxA*, como descritos na tabela 4.

Tabela 4. Primers específicos para detecção dos genes de virulência *lasB*, *algD* e *toxA*, em *Pseudomonas aeruginosa*

Gene	Seqüência (5' - 3')	Produto amplificado (pb)	Referência
<i>algD</i>	F: ATGCGAATCAGCATCTTTGGT R: CTACCAGCAGATGCCCTCGGC	1310	LANNOTE et al., 2004
<i>lasB</i>	F: GGAATGAACGAAGCGTTCTC R: GGTCCAGTAGTAGCGGTTGG	300	LANNOTE et al., 2004
<i>toxA</i>	F: GGTAACCAGCTCAGCCACAT R: TGATGTCCAGGTCATGCTTC	352	LANNOTE et al., 2004

Para amplificação dos genes de virulência foi utilizado 2 µL da suspensão da bactéria-teste (DNA extraído). A reação foi preparada para um volume final de 25µL. Em cada tubo foi adicionado água ultra pura autoclavada, tampão da Taq [10 x] diluído para uma concentração final de [1 x], 1,5 U de Taq DNA polimerase com MgCl₂, 0,2 mM do Mix de dNTPs, 0,5µM de cada primer descrito na tabela 4.

As condições da reação de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos, 30 ciclos com desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 60 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos, e extensão final a 72°C por 5 minutos.

A análise dos produtos da reação, eletroforese e documentação do gel foram realizadas como descrito no item 3.9.2.

3.9.5 Amplificação dos genes da região QRDR (*gyrA* e *parC*) (LEE et al., 2005)

Para a amplificação e posterior sequenciamento dos genes relacionados a resistência a fluorquinolonas foi realizado PCR simplex com os primers específicos para os genes *gyrA* e *parC* como descritos na tabela 5.

Tabela 5. Primers específicos para amplificação e sequenciamento dos genes *gyrA* e *parC* em *Pseudomonas aeruginosa*

Gene	Seqüência (5' - 3')	Produto amplificado (pb)	Referência
<i>gyrA</i>	F: GACGGCCTGAAGCCGGTGCAC R: GCCCACGGCGATACCGCTGGA	417	LEE et al., 2005
<i>parC</i>	F: CGAGCAGGCCTATCTGAACTAT R: GAAGGACTTGGGATCGTCCGGA	186	LEE et al., 2005

Para a amplificação dos genes da região QRDR foi utilizado 6 µL da suspensão da bactéria-teste (DNA extraído). A reação foi preparada para um volume final de 50µL. Em cada tubo foi adicionado água ultra pura autoclavada, tampão da Taq [10 x] diluído para uma concentração final de [1 x], 1,5 U de Taq DNA polimerase com MgCl₂, 0,2 mM do Mix de dNTPs, 0,5µM de cada primer descrito na tabela 5.

As condições da reação de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial de 94°C por 4 minutos, 35 ciclos com desnaturação a 94°C por 60 segundos, anelamento

a 55°C (para *parC*) e 65°C (para *gyrA*) por 60 segundos, extensão a 72°C por 60 segundos, e extensão final a 72°C por 4 minutos.

A análise dos produtos da reação, eletroforese e documentação do gel foram realizadas como descrito no item 3.9.2.

3.9.6 Sequenciamento dos fragmentos de DNA amplificados (*gyrA* e *parC*)

Os fragmentos amplificados referentes aos genes *gyrA* e *parC* foram sequenciados para identificação de possíveis mutações. Para o sequenciamento, os produtos amplificados foram purificados utilizando o Kit comercial Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA), conforme as instruções do fabricante.

Todas as etapas do sequenciamento foram realizadas em placas de 96 poços pela empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda. (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando o sequenciador automático *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer* armado com capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems). Os DNA-moldes (15 a 30ng) foram marcados utilizando-se 2,5 pmol de cada primer descrito na tabela 5 e 3 µL do reagente *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100* (Applied Biosystems) em um volume final de 10 µL. As reações de marcação foram realizadas em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems) com uma etapa de desnaturação inicial a 96°C por 3 minutos seguida de 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 55°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos. Uma vez marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com isopropanol a 75% e lavagem com etanol a 60%. Os produtos precipitados foram diluídos em 10 µL de formamida Hi-Fi (Applied Biosystems), desnaturados a 95°C por 5 minutos, resfriados em gelo por 5 minutos e eletroinjetados no sequenciador automático. Os dados de sequenciamento foram coletados utilizando-se o programa *Data Collection v 1.0.1* (Applied Biosystems) com os parâmetros *Dye Set* “Z”; *Mobility File* “DT3100POP6{BDv3}v1.mob”; *BioLIMS Project* “3100_Project1”; *Run Module 1* “StdSeq50_POP6_50cm_cfv_100”; e *Analysis Module 1* “BC-3100SR_Seq_FASTA.saz”.

As sequências obtidas foram analisadas no programa SeqMan e MegAlign (DNASTAR Inc. Madison, WI, USA) e comparadas as sequências disponíveis no banco de dados *GenBank*, número de acesso L29417 (*gyrA*) e AB003428 (*parC*).

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

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

Uma colônia bacteriana foi inoculada em 3 mL de caldo TSB e incubada *overnight* a 37° C, sob agitação a 200 rpm. Após o período de incubação, a medida da densidade óptica da suspensão bacteriana resultante foi ajustada para 0,9 a 1,10 (OD₆₄₀ nm). Uma alíquota de 200 μ L da suspensão celular foi transferida para um tubo *ependorf* centrifugada a 12.000 xg, 4° C por 2 minutos e o sobrenadante foi completamente descartado.

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

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

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

Para a corrida eletroforética, foi preparado gel de agarose 1% (Agarose Campo Pulsado, Agargen) em TBE 0,5X. Os blocos de agarose já digeridos foram dispostos no pente e o peso molecular (Lambda Ladder PFG Marker, New England Biolabs) foi colocado após a solidificação do gel, diretamente nos poços. A corrida eletroforética foi realizada em aparelho Chef DRIII System (Bio Rad, USA), utilizando-se solução tamponante TBE 0,5X, nas seguintes condições: pulso inicial de 5 segundos e final de 40 segundos, ângulo de 120°, 6 V/cm, a temperatura de 12° C durante 21 horas. Após a

eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídio 1µg/mL sob leve agitação por 45 minutos, e descorado em água destilada pelo mesmo período de tempo.

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

3.10 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.

3.11 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 47897 e 228/11 (ANEXOS III e IV).

4. RESULTADOS

4.1 População de estudo

No período de maio de 2009 a dezembro de 2012 e março de 2011 a novembro de 2012, um total de 157 e 60 pacientes não repetitivos, com bacteremia e PAV causadas por *P. aeruginosa*, respectivamente, internados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, foram incluídos no estudo.

Foram observados 162 episódios de bacteremia por *P. aeruginosa* e 60 episódios de PAV. Os experimentos realizados e as características das amostras estudadas estão descritos na figura 1.

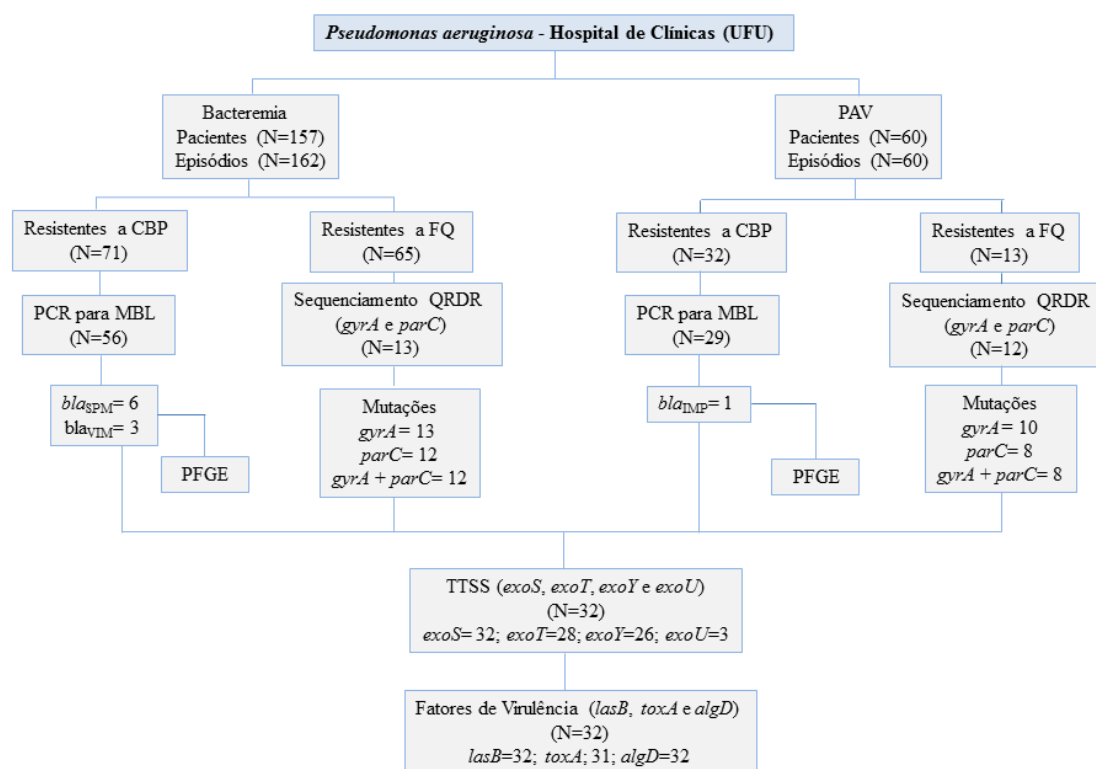


Figura 1: Organograma da população estudada referente a Bacteremia e Pneumonia Associada a Ventilação Mecânica (PAV) causadas por *Pseudomonas aeruginosa*. CBP, carbapenêmicos; FQ, fluoroquinolonas; PCR, Reação em Cadeia da Polimerase; MBL, metalo-β-lactamase; QRDR, Região Determinante de Resistência as Quinolonas; PFGE, *Pulsed Field Gel Electrophoresis*; TTSS, Sistema de Secreção Tipo III.

4.2 Preditores de mortalidade

Os fatores de risco associados com a mortalidade e as características clínicas e demográficas relevantes da população estudada, estão apresentadas nas tabelas 6 e 7. Quanto a coorte dos pacientes com bacteremia, a idade média dos pacientes foi de $51,3 \pm 25,1$ (0 a 89 anos) com a maioria dos pacientes internados nas unidades cirúrgicas e clínica médica (32,5% e 28,6%), respectivamente. Cerca de 76% dos pacientes apresentaram bacteremia primária com foco de infecção no CVC (13,8%) ou desconhecido (62,4%), enquanto nas secundárias (24,2%) o pulmão e o trato urinário foram os focos mais frequentes (17,2% e 3,8%, respectivamente). O uso de procedimentos invasivos com destaque para Ventilação Mecânica (VM) (56,7%), CVC (79,6%), Sonda Nasoenteral (SNG/SNE) (69,4%) e Sonda Vesical (SV) (64,3%), foram frequentes na população estudada. Aproximadamente 44% dos pacientes necessitaram de cirurgia e as principais comorbidades observadas incluíram insuficiência renal crônica (25,5%), cardiopatia (22,3%) e câncer (20,4%).

Os resultados da análise multivariada dos fatores de risco associados a mortalidade hospitalar em 30 dias evidenciou que os preditores independentemente associados com mortalidade foram pacientes que apresentavam doença de base grave, como câncer ($P= 0,012$), bem como pacientes que receberam terapia inapropriada ($P=0,0026$). O tempo médio de hospitalização após a admissão foi de 76,9 dias para os pacientes que sobreviveram e 30,9 para aqueles que evoluíram para o óbito. A curva de sobrevivência Kaplan-Meier demonstrou que os pacientes que receberam terapia inapropriada tiveram menor probabilidade de sobrevivência ($P= 0,0007$) em relação ao grupo que recebeu terapia apropriada (figura 2). A taxa de mortalidade em 30 dias foi 47,1% nos pacientes que receberam terapia inapropriada, enquanto que para o segundo grupo foi de 33,3%. A gravidade dos pacientes foi calculada através do score ASIS (tabela 6), e não foi encontrada diferença significativa entre os pacientes que sobreviveram e aqueles que evoluíram para o óbito.

Tabela 6. Fatores de risco associados com mortalidade hospitalar em 30 dias em pacientes com bacteremia por *Pseudomonas aeruginosa*

Fatores de Risco	Total N=157(%)	Óbito N= 68 (%)	Alta N=89 (%)	Univariada OR ¹ (IC ² 95%)	P ³	Multivariada OR (IC 95%)	P
Idade-média	51.36±25.10	56.10 ±22.74	47.73 ±26.31	-	0.065	-	-
Gênero						-	-
Masculino	105 (66.8)	44 (64.7)	61 (68.5)	0.84 (0.43-1.64)	0.737	-	-
Feminino	52 (33.1)	24 (35.3)	28 (31.5)	1.18 (0.60-2.31)	0.737	-	-
Tempo de hospitalização-média (dias)	57.01±56.93	30.90 ±26.34	76.97 ±65.48	-	0.0001*	-	-
Unidade de Terapia Intensiva	74 (47.1)	32 (47.1)	42 (47.2)	0.99 (0.52-1.87)	0.884	-	-
Cirurgia	69 (43.9)	30 (44.1)	39 (43.8)	1.01 (0.53-1.91)	0.9	-	-
Procedimentos Invasivos	139 (88.5)	61 (89.7)	78 (87.6)	1.22 (0.44-3.35)	0.88	-	-
Ventilação Mecânica	89 (56.7)	40 (58.8)	49 (55.0)	1.16 (0.61-2.21)	0.756	-	-
Traqueostomia	70 (44.6)	32 (47.1)	38 (42.6)	1.19 (0.63-2.25)	0.701	-	-
Sonda Vesical	101 (64.3)	48 (30.6)	53 (59.5)	1.63 (0.83-3.19)	0.206	-	-
Cateter Venoso Central	125 (79.6)	57 (83.8)	68 (76.4)	1.60 (0.71-3.59)	0.345	-	-
Dreno cirúrgico	24 (15.3)	12 (17.6)	12 (13.5)	1.37 (0.57 3.28)	0.62	-	-
SNG⁴/ SNE⁵	109 (69.4)	53 (33.7)	56 (62.9)	2.08 (1.01-4.26)	0.064	-	-
Hemodiálise	39 (24.8)	21 (13.4)	18 (20.2)	1.76 (0.84-3.65)	0.178	-	-
Nutrição Parenteral	25 (15.9)	10 (14.7)	15 (16.8)	0.85 (0.35-2.03)	0.885	-	-
Comorbidades	123 (78.3)	61 (89.7)	62 (69.6)	3.79 (1.53-9.36)	0.004*	2.42 (0.89-6.60)	0.083

Cardiopatia	35 (22.3)	18 (26.5)	17 (19.1)	1.52 (0.71-3.24)	0.365		
Câncer	32 (20.4)	21 (13.4)	11 (12.3)	3.16 (1.40-7.15)	0.007*	3.18 (1.28-7.90)	0.012*
Diabetes Mellitus	21 (13.4)	11 (16.2)	10 (11.2)	1.52 (0.60-3.83)	0.506	-	-
Insuficiência Renal Crônica	40 (25.5)	22 (32.3)	18 (20.2)	1.88 (0.91-3.89)	0.122	-	-
HIV⁶	10 (6.4)	8 (11.8)	2 (2.2)	5.80 (1.18-8.27)	0.020*	4.54 (0.80-5.70)	0.086
ASIS⁷ ≥ 4	81 (51.6)	39 (57.3)	42 (47.2)	1.50 (0.79-2.84)	0.270	-	-
Bacteremia Primária	119 (75.8)	46 (67.6)	73 (82.0)	0.45 (0.21-0.96)	0.057	0.76 (0.19-3.12)	0.711
Relacionada ao CVC⁸	21 (13.8)	6 (8.8)	15 (16.8)	0.47 (0.17-1.30)	0.219	-	-
Desconhecida	98 (62.4)	40 (58.8)	58 (85.3)	0.76 (0.39-1.46)	0.517	-	-
Bacteremia Secundária	38 (24.2)	22 (32.3)	16 (17.9)	2.18 (1.03-4.58)	0.06	-	-
Trato respiratório	27 (17.2)	17 (25.0)	10 (11.2)	2.63 (1.11-6.20)	0.040*	2.20 (0.45-0.90)	0.325
Trato urinário	6 (3.8)	2 (2.9)	4 (4.4)	0.64 (0.11-3.62)	0.698	-	-
Outros⁹	5 (3.2)	3 (4.4)	2 (2.2)	2.00 (0.32-2.36)	0.652	-	-
Resistência a Fluorquinolonas	65 (41.4)	32 (47.1)	33 (37.1)	1,40 (0,73-2,67)	0,390	-	-
Resistência a Carbapenêmicos	69 (43.9)	35 (51,5)	34 (38,2)	1,71 (0,90-3,25)	0,134	-	-
Multiresistência	66 (42.0)	31 (45,6)	35 (39,3)	1,29 (0,68-2,44)	0,532	-	-
Terapia Inapropriada	49 (31.2)	32 (47.1)	17 (19.1)	3.76 (1.84-7.66)	0.0003*	3.23 (1.50-6.94)	0.0026*

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

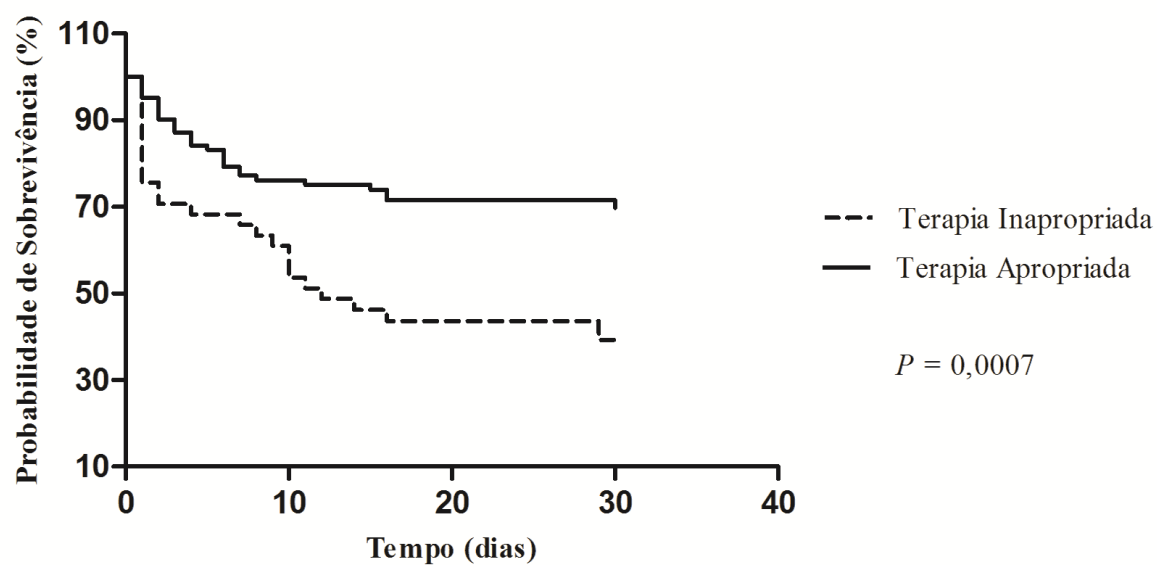


Figura 2: Curva de sobrevivência dos pacientes com bacteremia por *Pseudomonas aeruginosa* que receberam terapia antimicrobiana inapropriada em relação aqueles que receberam terapia antimicrobiana apropriada.

Com relação a coorte de pacientes com PAV, foi incluído apenas o primeiro episódio de cada paciente além de PAVs com um valor de CPIS ≥ 6 . Todos os episódios nessa série foram monomicrobianos, 32 (53,3%) resistentes a carbapenêmicos e 13 (21,6) resistentes a fluorquinolonas. Estes dados, assim como os fatores de risco associados a mortalidade em 30 dias estão na tabela 7. Cerca de 78,0% das PAVs foram classificadas como tardias e com taxa de mortalidade de 80,0% durante o período de hospitalização. A maioria dos pacientes estavam em uso de procedimentos invasivos com destaque para CVC (96,6%), SV (95%), e SNG/SNE (91,6%). A frequência de comorbidades foi semelhante aos pacientes com bacteremia, evidenciando insuficiência renal crônica (51,6%) seguido de cardiopatia (31,6%). Embora nenhum fator de risco associado com mortalidade tenha sido encontrado, os valores de *odds ratio* foram altos entre os pacientes que tiveram PAV por *P. aeruginosa* multirresistente (3,50, IC 1,00-12,21) que fizeram cirurgia (3,58, IC 0,71-7,92), usaram VM por mais de 40 dias (3,06, IC 0,89-0,52) e aqueles que apresentavam doenças de base grave como insuficiência renal crônica e doença pulmonar obstrutiva crônica (2,28, IC 0,67-7,76; 2.90, IC 0.76-2.70, respectivamente).

Tabela 7. Fatores de risco associados com mortalidade hospitalar em 30 dias em pacientes com Pneumonia Associada a Ventilação Mecânica por *Pseudomonas aeruginosa*

Fatores de Risco	Total N= 60 (%)	Óbito N=15 (%)	Alta N=45 (%)	Univariada OR ¹ (IC ² 95%)	P ³
Idade-média	50.47±4.85	55.87±22.60	48.67±38.12	—	0.075
Gênero					
Masculino	47 (78.3)	12 (80.0)	35 (77.7)	1.14 (0.26-4.85)	0.856
Feminino	13 (21.6)	3 (20.0)	10 (22.2)	0.87 (0.20-3.70)	0.856
Tempo de hospitalização UTI ⁴ (≥ 40 days)	19 (31.6)	3 (20.0)	16 (35.5)	0.45 (0.11-1.84)	0.346
Procedimentos Invasivos					
Uso de VM ⁵ (≥ 40 days)	17 (28.3)	7 (46.6)	10 (22.2)	3.06 (0.89-0.52)	0.136
Cirurgia	42 (70.0)	13 (86.6)	29 (64.4)	3.58 (0.71-7.92)	0.193
Traqueostomia	44 (73.3)	11 (73.3)	33 (73.3)	1.00 (0.26-3.74)	0.736
Sonda Vesical	57 (95.0)	14 (93.3)	43 (95.5)	0.65 (0.05-7.73)	0.732
Cateter Venoso Central	58 (96.6)	15 (100)	43 (95.5)	1.78 (0.08 -9.23)	1
Dreno Cirúrgico	17 (28.3)	4 (26.6)	13 (28.8)	0.89(0.24 -3.32)	1
SNG ⁶ /SNE ⁷	55 (91.6)	14 (93.3)	41 (91.1)	1.36 (0.14-3.27)	0.787
Hemodiálise	31 (51.6)	10 (66.6)	21 (46.6)	2.28 (0.67-7.76)	0.296
Comorbidades	19 (31.6)	7 (46.6)	12 (26.6)	2.40 (0.71-8.07)	0.262
Cardiopatía	19 (31.6)	5 (33.3)	14 (31.1)	1.10 (0.31-3.84)	1.000
Câncer	3 (5.0)	0	3 (6.6)	0.39 (0.01- 8.03)	0.566
Diabetes Mellitus	12 (20.0)	4 (26.6)	8 (17.7)	1.68 (0.42-6.65)	0.472
Insuficiência Renal	31 (51.6)	10 (66.6)	21 (46.4)	2.28 (0.67-7.76)	0.296
DPOC ⁸	9 (15.0)	4 (26.6)	5 (11.1)	2.90 (0.76-2.70)	0.208
CPIS ⁹ ≥ 8	37 (61.6)	11 (73.3)	26 (57.7)	2.00 (0.55-7.28)	0.443
Índice de Comorbidade de Charlson ≥ 5	38 (63.3)	9 (60.0)	29 (64.4)	0.82 (0.24-2.74)	1
PAV ¹⁰					
PAV tardia	13 (21.6)	3 (20.0)	10 (22.2)	0.87 (0.20-3.72)	1
PAV precose	47 (78.3)	12 (80.0)	35 (77.7)	1.14 (0.26-4.85)	0.856
Resistência a Fluorquinolonas	13 (21,6)	5 (33,3)	8 (17,7)	2,31 (0,61-8,63)	0,278
Resistência a Carbapenêmicos	32 (53,3)	8 (53,3)	24 (53,3)	1,00 (0,31-3,22)	0,765
Multirresistência	16 (26,6)	7 (46,6)	9 (20,0)	3,50(1,00-12,21)	0,091
Terapia Inapropriada	26 (43.3)	7 (46.6)	19 (42.2)	1.19 (0.37-3.87)	1

¹Do inglês “Odds Ratio”; ²Intervalo de Confiança; ³ Valor de P; ⁴ Unidade de Terapia Intensiva; ⁵Ventilação Mecânica; ⁶Sonda Nasogástrica; ⁷Sonda Nasoenteral ⁸Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica; ⁹Do inglês “Clinical Pulmonary Infection Score”; ¹⁰Pneumonia Associada a Ventilação Mecânica

4.3 Distribuição dos genes codificadores de metalo- β -lactamases, TTSS, genes de virulência e taxas de resistência aos antibióticos

A tabela 8 resume a caracterização das cepas de *P. aeruginosa* quanto a produção de metalo- β -lactamase, perfil de resistência, genótipo TTSS e genes de virulência das amostras clínicas resistentes a carbapenêmicos e fluorquinolonas incluídas no estudo.

De acordo com a PCR, o genótipo TTSS para os genes codificadores das citotoxinas ExoU, ExoS, ExoY e ExoT, revelaram que todas as 32 amostras analisadas carregavam o gene *exoS*, 87,5% carregavam o gene *exoT* e 81,2% carregavam o gene *exoY*. O genótipo *exoS⁺exoT⁺exoY⁺*, foi observado em 68,7% das cepas. Três amostras 9,4%, foram positivas para ambos os genes efetores *exoU* e *exoS*, o gene *exoU* foi observado somente em 9,4% das amostras. O genótipo *exoS⁺exoT⁺exoY⁺exoU⁺* foi observado em duas amostras recuperadas do sangue. De modo geral, o perfil de genes que codificam as exotoxinas foi semelhante entre as amostras de sangue e PAV (ANEXO V).

As amostras de *P. aeruginosa* recuperadas do sangue foram mais sensíveis aos carbapenêmicos (56,2%) que aqueles recuperados do pulmão (46,6%). No total, houve relação entre a frequência elevada de resistência aos carbapenêmicos (46,4%) e fluorquinolonas (35,1%).

As taxas de resistência foram semelhantes entre as amostras positivas para os genes *exoT*, *exoS*, *exoU* e *exoY*, com altas frequências de resistência aos carbapenêmicos (100%), ciprofloxacina (100%) e gentamicina 93,7% e baixas taxas de resistência a amicacina (37,5%). As cepas recuperadas do sangue foram mais resistentes a cefepime (94,7%), amicacina (56,2%) e piperacilina/tazobactam (84,2%) que aquelas recuperadas do pulmão. No geral, as cepas apresentaram perfil de multirresistência (100%), entre as *P. aeruginosa* positivas para os genes TTSS.

A PCR para metalo- β -lactamase foi realizado para 56 amostras de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos recuperados do sangue e 29 do pulmão, 16,1% (9/56) e somente 3,4% (1/29) das amostras apresentaram amplicon consistente com os genes produtores de metalo- β -lactamase, respectivamente, identificados como *bla_{SPM-1}* em 66,6% (6/9), *bla_{VIM-type}* em 33,3% (3/9) e *bla_{IMP-type}* em 3,4% (1/29), este último detectado apenas no pulmão (ANEXO VI).

Comparando a detecção dos genes de virulência analisados (*lasB*, *toxA* e *algD*) entre os dois grupos (sangue e pulmão) em amostras de *P. aeruginosa* foi observada frequências elevadas em todos os isolados, independente se a amostra foi resistente aos carbapenêmicos e/ou fluorquinolonas (ANEXO VII).

Tabela 8. Caracterização das amostras de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos e fluorquinolonas com relação a produção de metalo-β-lactamase, genótipo do Sistema de Secreção Tipo III, perfil de resistência e fatores de virulência

Sítio	PA ¹ resistentes CBP ² /Total FQ ³ /Total N(%)	Analisadas /MBL ⁴ positivas N(%)	PCR ⁵ gene pb (isolados)	Analisadas genótipo TTSS ⁶ / Total	Perfil TTSS (isolados)	Perfil de Resistência (%)	Perfil de Virulência (<i>lasB</i> , <i>toxA</i> , <i>algD</i>) N(%)	
Sangue	71/162 (43.8)	56/9(16,1)	271/ <i>bla</i> _{SPM} (6)	19/162	<i>exoU</i> (2)	CPM ⁷ (50.0) GEN ⁸ (100) AMI ⁹ (0) PPT ¹⁰ (50.0)	<i>lasB</i> ⁺ / <i>toxA</i> ⁺ / <i>algD</i> ⁺ 19/19 (100)	
			390/ <i>bla</i> _{VIM} (3)		<i>exoS</i> (19)	CPM (94.7) GEN (94.7) AMI (52.6) PPT (84.2)		
	65/162 (40.1)				<i>exoT</i> (16)	CPM (93.7) GEN (93.7) AMI (56.2) PPT (81.2)		
					<i>exoY</i> (15)	CPM (93.3) GEN (93.3) AMI (40.0) PPT (80.0)		
					<i>exoS/exoT/exoY</i> (12)	CPM (83.3) GEN (75.0) AMI (41.6) PPT (66.6)		
					<i>exoS/exoT/exoY/exoU</i> (2)	CPM (50.0) GEN (100) AMI (0) PPT (50.0)		
Pulmão	32/60 (53.3)	29/1 (3.4)	188/ <i>bla</i> _{IMP} (1)		<i>exoU</i> (1)	CPM (100) GEN (100) AMI (100) PPT (0)	<i>lasB</i> ⁺ / <i>toxA</i> ⁺ / <i>algD</i> ⁺ 12/13 (92.3)	
					<i>exoS</i> (13)	CPM (76.9) GEN (92.3) AMI (15.4) PPT (23.1)		
	13/60 (21.6)				13/60	<i>exoT</i> (12)	CPM (75.0) GEN (91.6) AMI (16.6) PPT (25.0)	
						<i>exoY</i> (11)	CPM (72.7) GEN (100) AMI (9.1) PPT (18.2)	
						<i>exoS/exoT/exoY</i> (10)	CPM (70.0) GEN (100) AMI (10.0) PPT (20.0)	<i>lasB</i> ⁺ / <i>toxA</i> ⁻ / <i>algD</i> ⁺ 1/13 (7.7)
						<i>exoS/exoT/exoY/exoU</i> (0)		

¹*Pseudomonas aeruginosa*; ²CBP: carbapenêmicos; ³FQ: fluorquinolonas; ⁴Metalo-Beta-lactamase; ⁵Reação em Cadeia da Polimerase; ⁶Sistema de Secreção do Tipo III; ⁷CPM, cefepime; ⁸GEN, Gentamicina; ⁹AMI, Amicacina; ¹⁰PPT, Piperacilina-Tazobactam

Na tabela 9 está a comparação das mutações de sítio ativo nos genes *gyrA* e *parC* em relação ao genótipo efetor TTSS. A substituição de uma treonina por uma isoleucina na posição 83 em *gyrA* foi a mutação mais comum encontrada entre as amostras clínicas de *P. aeruginosa* e em proporções semelhantes entre as amostras positivas para os genes *exoS* (92%), *exoY* (76%) e *exoT* (76%). Foi observado em uma amostra de *P. aeruginosa* multirresistente e positiva para o gene *exoU*, além da substituição na posição 83 em *gyrA* (Thre83Ile), uma mutação no QRDR no gene *parC* na posição 91 (Glu91Lys). Dezenove amostras de *P. aeruginosa* mostraram alterações no gene *parC*, todos com a substituição Ser87Leu, e nenhuma cepa apresentou mutação somente no gene *parC*.

Tabela 9. Comparação das amostras de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos e fluorquinolonas com relação as mutações de sítio ativo nos genes *gyrA* e *parC* de acordo com o genótipo do Sistema de Srecreção Tipo III

Mutações QRDR ¹		<i>exoU</i>	<i>exoS</i>	<i>exoY</i>	<i>exoT</i>
(N=25)		N(%)	N(%)	N(%)	N(%)
<i>gyrA</i>	Thre83Ile (23)	1 (4)	23 (92)	19 (76)	19 (76)
	Ser87Leu (19)	0	19 (76)	16 (64)	16 (64)
<i>parC</i>	Glu91Lys (1)	1 (4)	1 (4)	0	1 (4)
<i>gyrA</i> + <i>parC</i>	Thre83Ile + Ser87Leu (19)	0	19 (76)	16 (64)	16 (64)
	Thre83Ile + Glu91Lys (1)	1 (4)	1 (4)	0 (4)	1 (4)

¹ QRDR, Região Determinante de Resistência as Quinolonas

4.4 Tipagem Molecular

Todas as amostras de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos incluídas na análise molecular tiveram o gene para metalo- β -lactamase confirmados pela técnica de PCR (ANEXO VI). A similaridade genética entre as amostras foi realizada pela técnica de PFGE, e em função do custo, foram incluídas dez amostras de *P. aeruginosa*, sendo seis contendo o gene *bla*_{SPM}, três contendo o gene *bla*_{VIM} e uma contendo o gene *bla*_{IMP},

recuperadas de sangue e aspirado traqueal. Não foi possível determinar o perfil de macrorrestrição de uma amostra contendo o gene *bla_{SPM}*, devido a degradação do DNA.

Os resultados obtidos geraram o dendrograma de similaridade genética apresentados na figura 3. No total foram encontrados seis perfis genotípicos distintos de *P. aeruginosa* diferenciadas entre si por um coeficiente de similaridade acima de 80%, dois correspondendo as amostras contendo o gene *bla_{SPM}* (A e B) e quatro correspondendo as amostras contendo o gene *bla_{VIM}* (C, D e F) e *bla_{IMP}* (E). Apenas o clone A apresentou 4 subtipos (A1, A2, A3 e A4). Observou-se a disseminação do clone A na UTI e clínica cirúrgica no mesmo período de isolamento das amostras, assim como disseminação policlonal das amostras contendo o gene *bla_{VIM}*, nas clínicas médicas e cirúrgicas (Tabela 10).

O teste de sensibilidade aos antimicrobianos mostrou que todas as amostras de *P. aeruginosa* analisadas apresentaram perfil de multirresistência. As amostras contendo o gene *bla_{SPM}* pertencentes ao clone A (A1, A2, A3 e A4) apresentaram o mesmo perfil de resistência, enquanto a amostra do pulstipo B, contendo o mesmo gene, mostrou-se sensível a amicacina (Tabela 10).

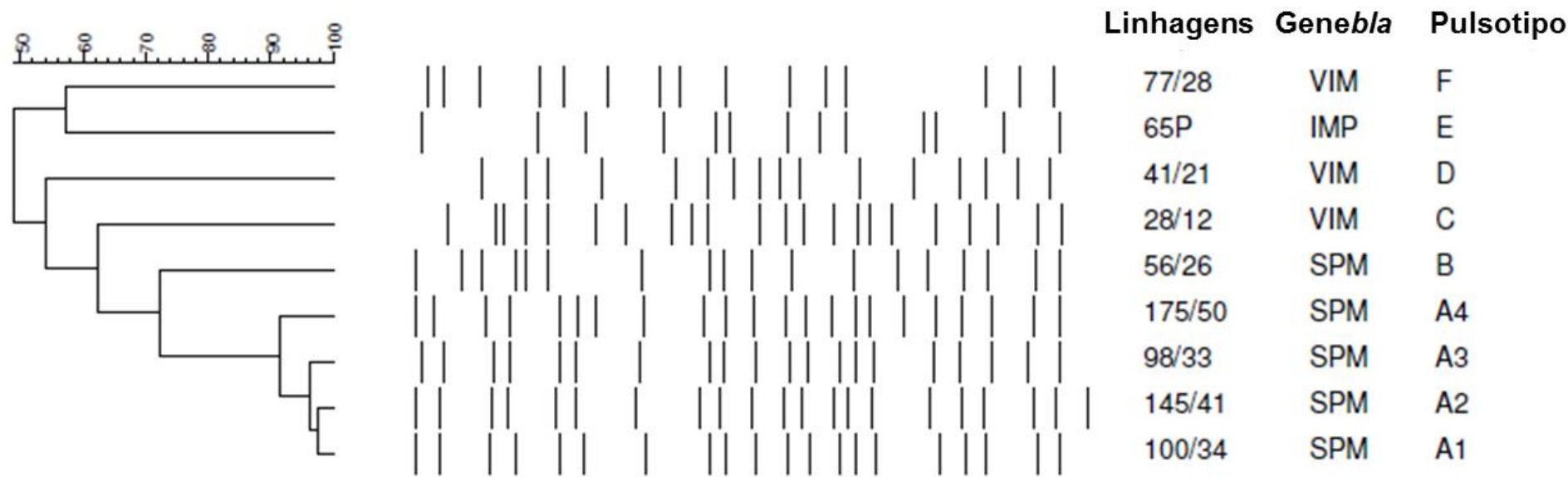


Figura 3: Dendrograma da análise dos perfis do *Pulsed-field Gel Electrophoresis* (PFGE), linhagens, genótipo e pulsotipo das amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de sangue e aspirado traqueal. Escala representa as porcentagens de similaridade.

Tabela 10. Perfil fenotípico e genotípico de resistência, sítio e data de isolamento das amostras de *Pseudomonas aeruginosa* caracterizadas por Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE)

Gene <i>bla</i>	Pulsotipo PFGE ¹	Sítio	Clínica	Data de isolamento	Perfil de Resistência
VIM	F	sangue	CM ²	06/07/2011	CAZ ⁵ ;CPM ⁶ ;PPT ⁷ ;CRB ⁸ ;CIP ⁹ ;LVX ¹⁰ ;GEN ¹¹ ;ATM ¹²
IMP	E	aspirado traqueal	UTI ³	21/02/2012	CIP; GEN; CRB
VIM	D	sangue	CIR ⁴	31/01/2011	CAZ; CPM; PPT; CRB; CIP; LVX; GEN; ATM
VIM	C	sangue	CM	17/11/2010	CAZ; CPM; PPT; CRB; CIP; LVX
SPM	B	sangue	CIR	26/03/2011	CAZ; CPM; PPT; CRB; CIP; LVX; GEN
SPM	A4	sangue	CIR	07/08/2012	CAZ; CPM; PPT; CRB; CIP; LVX; GEN; AMI ¹³
SPM	A3	sangue	CIR	06/09/2011	CAZ; CPM; PPT; CRB; CIP; LVX; GEN; AMI
SPM	A2	sangue	UTI	30/03/2012	CAZ; CPM; PPT; CRB; CIP; LVX; GEN; AMI
SPM	A1	sangue	UTI	10/09/2011	CAZ; CPM; PPT; CRB; CIP; LVX; GEN; AMI

¹PFGE, *Pulsed-field Gel Electrophoresis*; ²CM, Clínica Médica; ³UTI, Unidade de Terapia Intensiva; ⁴CIR, Cirúrgica; ⁵CAZ, Ceftazidima; ⁶CPM, Cefepime; ⁷PPT, Piperacilina Tazobactam; ⁸CRB, Carbapenêmicos; ⁹CIP, Ciprofloxacina; ¹⁰LVX, Levofloxacina; ¹¹GEN, Gentamicina; ¹²ATM, Aztreonam; ¹³AMI, Amicacina.

5. DISCUSSÃO

Para nosso conhecimento, este trabalho representa o primeiro estudo abrangente no Brasil sobre bacteremia e PAV causadas por *P. aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos e fluorquinolonas, produção de metalo- β -lactamase, mutações do QRDR e virulência. Além disso, nós também avaliamos o impacto da terapia inapropriada na mortalidade de pacientes internados em hospital terciário com infecções graves.

As Infecções Relacionadas à Assistência a Saúde são reconhecidas como um problema global com sérias implicações para pacientes hospitalizados, especialmente nos países em desenvolvimento, e ainda não tem recebido atenção compatível em relação ao seu impacto na saúde pública (ROSENTHAL et al., 2006; ROBERTS et al., 2010; GUPTA et al., 2011). Aliado a isso, existe a frequente emergência e disseminação de microrganismos resistentes aos antimicrobianos, especialmente bacilos gram-negativos não fermentadores, como *P. aeruginosa* (SADER et al., 2001; BREIDENSTEIN et al., 2011; VOOR IN'T HOLT et al., 2014).

Na Europa, um estudo de prevalência realizado em 17 países incluindo 1417 Unidades de Terapia Intensiva demonstraram que as infecções mais frequentes foram: pneumonia (46,9%), seguida de infecção do trato respiratório inferior (17,8%), infecção de trato urinário (17,6%) e infecção de corrente sanguínea (12,0%) (ERBAY et al., 2003). No Brasil, em investigação recente em hospital universitário a taxa de infecção hospitalar foi de 20,3% nos pacientes internados, sendo 37,6% do trato urinário, 25,6% pneumonia, 15,1% bacteremia, 14,1% infecção do sítio cirúrgico e 7,7% outras infecções (OLIVEIRA et al., 2010).

Bacteremias e pneumonias estão entre as complicações infecciosas mais graves decorrente de hospitalização e cuidados médicos (MITT et al., 2009) estando associadas a altas taxas de mortalidade e tempo de hospitalização prolongado, especialmente em pacientes críticos (MICEK et al., 2005). Nas últimas décadas, tem sido observado aumento na incidência das infecções de corrente sanguínea, refletindo entre outros fatores, a frequente utilização de procedimentos invasivos (NNIS, 2001 e DIEKEMA et al., 2003), particularmente o cateter venoso central, o qual é considerado um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento deste tipo de infecção (LEAO et al., 2007).

Bacteremia hospitalar causada por microrganismos multirresistentes, quer seja gram-positivos ou gram-negativos, tem sido descrita frequentemente como um importante problema de saúde, ou por aumentar os custos hospitalares ou por tornar mais difícil o estabelecimento de uma terapia antimicrobiana apropriada o que resulta em pior prognóstico dessas infecções (FILICE et al., 2010; WILKE, 2010; VIALE et al., 2013). Na América Latina, entre o período de 2008 a 2010, bactérias como a *P. aeruginosa* foram mais frequentemente isoladas de hemoculturas, sendo 34,7% resistentes a carbapenêmicos e 41,2% resistentes a fluorquinolonas (GALES et al., 2012). No Brasil, um estudo feito em 16 hospitais, mostrou que a participação de bactérias gram-negativas isoladas de hemoculturas é alta (58,5%) principalmente nos hospitais universitários (MARRA et al., 2011).

Em relação as pneumonias, destacam-se aquelas associadas ao uso de ventilação mecânica (CHASTRE, 2005; SAFDAR et al., 2005; TEJERINA et al., 2006), sendo considerada o tipo de infecção hospitalar mais comum em adultos internados em UTIs (SAFDAR et al., 2005; TEJERINA et al., 2006; PELEG; HOOPER, 2010). 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 e colaboradores (2012) demonstraram que a ocorrência de PAV é comum na UTI de adultos do HC-UFU, com taxa de incidência de 15,6/1000 pacientes-dia além de estar associada a um pior prognóstico.

Neste estudo, nós investigamos uma coorte de 157 pacientes com bacteremia e 60 pacientes com PAV causadas por *P. aeruginosa*. No primeiro grupo 42% das amostras de *P. aeruginosa* tiveram perfil de multirresistência e 24,8% perfil extensivamente resistente. Entre os estudos que avaliaram a mortalidade de pacientes com bacteremia por *P. aeruginosa*, os resultados demonstram a importância da resistência antimicrobiana, terapia inadequada e gravidade das doenças de base associadas com as taxas de mortalidade (KANG et al., 2005; LODISE et al., 2007; SUAREZ et al., 2010; MORALES et al., 2012; VOOR IN'T HOLT et al., 2014). Nossos resultados foram semelhantes e mostraram que pacientes com câncer e aqueles que receberam terapia antimicrobiana inadequada foram fatores de risco independentemente associados com a mortalidade. Nosso estudo confirmou ainda a noção de que os pacientes que desenvolveram bacteremia por *P. aeruginosa*, principalmente aquelas resistentes aos antimicrobianos normalmente tem piores

resultados no tratamento e pode indicar um forte fator prognóstico para mortalidade. Semelhante aos nossos achados, estudos anteriores mostram que *P. aeruginosa* isoladas de pacientes que receberam terapia inapropriada tiveram pior prognóstico em 46,1% e 53,8% dos casos, respectivamente (JOO et al., 2011; MORATA et al., 2012).

Entre os pacientes admitidos na UTI com PAV, mesmo após ajustar a gravidade da doença e as condições de base, não foi encontrado nenhum fator de risco significativo associado com mortalidade, isso pode ser justificado pelo baixo número de pacientes incluídos neste estudo. Entretanto, nós observamos altos valores de *odds ratio* nos pacientes que fizeram cirurgia, uso de ventilação mecânica por mais que 40 dias e aqueles que apresentavam doenças de base, como insuficiência renal crônica e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). Em um período curto de observação, foi possível detectar que cerca de 27% das amostras de *P. aeruginosa* foram multirresistentes e 3,3% foram extensivamente resistentes. Esses dados são preocupantes considerando que *P. aeruginosa* resistente a muitos antimicrobianos continuam a emergir e novas alternativas de tratamento não estão disponíveis, e além disso, a *P. aeruginosa* está entre os patógenos mais problemáticos sendo um exemplo de organismo em que a resistência emerge com relativa facilidade.

O diagnóstico de pneumonia hospitalar é difícil, exigindo a utilização de critérios clínicos, radiológicos, laboratoriais e microbiológicos (XIE et al., 2011). Os dados clínicos apresentam baixa especificidade, mas em função da gravidade são usualmente utilizados para o início de terapia antibiótica empírica de amplo espectro (NIEDERMAN, 2005). Os métodos diagnósticos microbiológicos quantitativos são mais específicos e incluem: lavado broncoalveolar com e sem broncoscopia (minibal) e o escovado protegido. Adicionalmente, há o aspirado traqueal como uma alternativa, de custo mais baixo, com boa sensibilidade, mas especificidade questionada. No entanto, a utilização de um ponto de corte 10^6 UFC/mL para definição de positividade melhora a sua especificidade quando comparada a de técnicas invasivas (DAVIS, 2006). Além desses critérios, no nosso estudo o diagnóstico de PAV foi reforçado utilizando-se o score CPIS, que é calculado com base em pontos atribuídos a vários sinais e sintomas de pneumonia, como descrito na metodologia proposta por Zilberberg e Shorr, 2010.

P. aeruginosa tem um amplo espectro de mecanismos de resistência intrínsecos e adquiridos a vários antimicrobianos (BREIDENSTEIN et al., 2011; MORALES et al., 2012). A resistência aos carbapenêmicos resulta frequentemente da produção de β -lactamases, particularmente β -lactamases que hidrolisam carbapenêmicos, como as

metalo- β -lactamases (SADER et al., 2005; BREIDENSTEIN et al., 2011; VAN DER BIJ et al., 2011; VAN DER BIJ et al., 2012). Nossos resultados mostraram que *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos foi prevalente em todo o hospital, entretanto, quando comparamos bacteremia e PAV, a resistência aos carbapenêmicos foi mais frequente entre as amostras de PAV (53,3%), mas sem a detecção de genes produtores de metalo- β -lactamases, exceto para um isolado caracterizado como do genótipo *bla*_{IMP}, o contrário foi observado no sangue, onde a frequência de amostras positivas para os genes que codificam a produção de metalo- β -lactamase foi mais alta (16,1%), sendo 10,7% do genótipo *bla*_{SPM} e 5,3% do genótipo *bla*_{VIM}. Estes resultados sugerem que outros mecanismos de resistência coexistem nessas cepas, incluindo a perda da porina OprD e hiperexpressão de bombas de efluxo, não avaliados nesse estudo. Entre as amostras positivas para o genes produtores de MBL, 77,8% mostraram fenótipo extensivamente resistente.

A emergência de cepas de *P. aeruginosa* produtoras de MBL no Brasil é amplamente disseminada principalmente associada a um clone predominante caracterizado como ST-277 (SPM-1) (GALES et al., 2003; LUCENA et al., 2014), que tem sido ampliada por vários relatos do mesmo clone em outras regiões do país (GALES et al., 2003; CIPRIANO et al., 2007; GASPARETO et al., 2007; CEZARIO et al., 2009; XAVIER et al., 2010). Os nossos dados sugerem que, no nosso hospital, além do clone SPM há a disseminação de cepas produtoras de metalo- β -lactamase do tipo VIM e IMP, ainda não detectados em estudos anteriores. No Brasil, tem-se observado também um aumento na frequência de amostras de *P. aeruginosa* contendo o gene *bla*_{VIM} (SADER et al., 2005; FRANCO et al., 2010), porém são necessários mais estudos que confirmem esses dados. O encontro frequente de diferentes tipos de metalo- β -lactamase no Brasil e não em outros países, principalmente naqueles desenvolvidos sugerem a disseminação de clones específicos e o conhecimento desses fatos pode, sem dúvida, contribuir para melhoria do cenário de multirresistência.

Não conseguimos encontrar a origem da metalo- β -lactamase em 60% (15/25) das amostras em que foram detectadas sua produção (essa avaliação foi feita através de testes fenotípicos não demonstrados neste trabalho). Pode ser que nessas cepas haja a presença de uma metalo- β -lactamase, porém não amplificável com os iniciadores utilizados, entretanto mais pesquisas deverão ser feitas nessas cepas para determinar o exato mecanismo de resistência. Em uma avaliação prévia da relação clonal entre as amostras contendo os genes *bla*_{SPM} e *bla*_{VIM}, observou-se alta similaridade (maior que

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

Além da resistência aos carbapenêmicos, outro problema significativo é o aumento do número de infecções causadas por *P. aeruginosa* resistentes a fluorquinolonas, em diversas partes do mundo, inclusive no Brasil. Isso se justifica pela presença concomitante de vários mecanismos de resistência aos antibióticos, os quais são extensivamente utilizados na prática clínica. Atualmente, muitas publicações tem enfatizado o aumento do percentual de *P. aeruginosa* que apresentam sensibilidade diminuída as fluorquinolonas e o seu impacto na evolução do paciente, e o tratamento prévio com fluorquinolona sendo um dos principais fatores de risco para colonização/infecção por *P. aeruginosa* multirresistente o que pode resultar na pior evolução clínica em pacientes infectados (HSU et al., 2005; GASINK et al., 2006). De acordo com esses resultados, nossos dados mostraram através da análise univariada que a mortalidade está associada com resistência a fluorquinolona em pacientes com infecções graves (PAV e bacteremia) ($P= 0.023$) (dados não demonstrados).

Evidências indiretas de estudos epidemiológicos sugerem que a resistência a fluorquinolona e a expressão de virulência TTSS são fatores independentemente associados com piores prognósticos em infecções causadas por *P. aeruginosa* multirresistentes (ROY-BURMAN et al., 2001; WONG-BERINGER et al., 2008; BLEVES et al., 2012; EL-SOLH et al., 2012). Embora essa relação não tenha sido feita no nosso estudo, o gene *exoS* foi detectado em todas as amostras clínicas, enquanto que a presença do gene *exoT* e *exoY* ocorreu em frequências variadas, e ao contrário de outros resultados, a presença do gene *exoU* foi detectado em baixa frequência entre as nossas amostras de *P. aeruginosa* (9.4%) (WAREHAM; CURTIS, 2007; EL-SOLH et al., 2012).

Alguns dados publicados na literatura reportaram que cepas de *P. aeruginosa* positivas para o gene *exoU* apresentam maiores taxas de multirresistência quando comparadas as amostras *exoS* positivas (GAREY et al., 2008; WONG-BERINGER et al., 2008). Na nossa casuística essa relação não foi observada, uma vez que, as cepas com genótipo TTSS foram todas multirresistentes, sugerindo mais uma vez a importância dos vários elementos genéticos associados a resistência disseminados no ambiente hospitalar, fazendo com que essas amostras apresentem co-resistência a múltiplos antimicrobianos. Nós notamos também uma alta frequência de resistência a gentamicina entre as amostras que carregavam os genes *exoS*, *exoT*, *exoY* e *exoU*, essa resistência parece ser droga-específica e não classe-específica, uma vez que essas amostras apresentaram baixa frequência de resistência a amicacina.

De acordo com os estudos, as cepas de *P. aeruginosa* secretam frequentemente três exotoxinas concomitantemente, sendo a ExoS e ExoU, mutualmente exclusivas (VANCE et al., 2005). No nosso estudo, aproximadamente 7% das cepas apresentaram os quatro genes que codificam as citotoxinas (genótipo *exoY⁺exoT⁺exoS⁺exoU⁺*) e quase 10% apresentaram os genes *exoS* e *exoU* juntos. Não foi encontrada na literatura a correlação entre a presença dos quatro genes concomitantemente e sua significância clínica, vale ressaltar que essas cepas são mais virulentas e provavelmente podem estar associadas com pior prognóstico em infecções graves.

O principal mecanismo que contribui para a resistência a fluorquinolonas em *P. aeruginosa* está associado com substituições nos genes *gyrA* e *parC* presentes na região QRDR (LEE et al., 2005). No nosso estudo, com relação a essas mutações de sítio ativo, nós observamos em todas as amostras mutações consistentes com aquelas previamente publicadas (MOUNEIMNÉ et al., 1999; HIGGINS et al., 2003; LEE et al., 2005). A substituição de uma treonina por uma isoleucina na posição 83 em *gyrA* foi a mutação mais encontrada em nossas cepas. Mutações duplas em *gyrA-parC* foram também frequentes (80.0%), assim nossos resultados confirmam conhecimentos prévios a respeito dos mecanismos de mutações cumulativas.

Alterações presentes em *gyrA* e *parC* foram descritas em trabalhos no Brasil em isolados da família Enterobacteriaceae (ITO et al., 2008; MINARINI; DARINI, 2012), ao nosso conhecimento, não há trabalhos publicados em nosso país a respeito dessas mutações em amostras clínicas de *P. aeruginosa*, sendo assim, descrevemos uma mutação na posição 91 no gene *parC* (Glu91Lys) associado com mutação no gene *gyrA*

(Thre83Ile) em uma amostra de *P. aeruginosa* extensivamente resistente, do genótipo *exoT⁺exoS⁺exoU⁺*, não descrita no Brasil até o momento.

Além do Sistema de Secreção do Tipo III, *P. aeruginosa* possui um grande número de fatores de virulência extracelulares que também contribuem para a patogenicidade e gravidade dessas infecções como aqueles codificados pelos genes *lasB*, *algD* e *toxA*. Nossos dados mostraram que além de um perfil de multirresistência somada a presença dos genes do TTSS, todas as amostras foram positivas para os genes de virulência *lasB*, *algD* e *toxA*, exceto para uma amostra que não apresentou o gene *toxA*, o que pode contribuir ainda mais para piores prognósticos associados a infecções graves.

Outros pesquisadores tem demonstrado que a terapia antimicrobiana inapropriada está intimamente associada com pior prognóstico nas infecções por *P. aeruginosa* (KANG et al., 2005; LODISE et al., 2007), mas nossos resultados sugerem que a multirresistência e a virulência TTSS associada com outros genes de virulência como *lasB*, *toxA* e *algD*, devem ser também adicionados a lista dos fatores responsáveis para o aumento das taxas de mortalidade em infecções graves causadas por *P. aeruginosa*.

6. CONCLUSÕES

- A frequência dos genes que codificam as metalo- β -lactamases foi mais alta nas amostras de *P. aeruginosa* recuperadas do sangue (16,1%) e menor naquelas de pulmão (3,4%).
- O gene *bla_{SPM}* foi o mais frequente, entretanto outros genes como *bla_{IMP}* e *bla_{VIM}*, ainda não relatados em estudos prévios no nosso hospital, foram detectados.
- Foi observada alta frequência de *P. aeruginosa* com baixa sensibilidade a fluorquinolonas (35,1%) e carbapenêmicos (46,4%), com taxas expressivas de amostras multirresistentes em ambos os grupos e extensivamente resistentes nas amostras de bacteremia.
- Ao contrário de outros estudos, a frequência do gene *exoU* na nossa casuística foi baixa, e foi observada uma taxa de 6,3% de amostras do genótipo *exoY⁺exoT⁺exoS⁺exoU⁺*.
- Na coorte de pacientes com bacteremia, a terapia antimicrobiana inapropriada foi fator de risco independentemente associado com mortalidade, o que não pode ser observado nos pacientes com PAV.
- Nós observamos na maioria das amostras de *P. aeruginosa* analisadas, mutações em *gyrA* sendo que as mutações duplas *gyrA/parC* foram frequentes.
- Foi relatada mutação no gene *parC* na posição 91 (Glu91Lys), associado com mutação no gene *gyrA* (Thre83Ile) em uma amostra de *P. aeruginosa* extensivamente resistente, do genótipo *exoT⁺exoS⁺exoU⁺*, ainda não descrita no Brasil.
- Quase a totalidade das amostras apresentaram todos os genes de virulência *lasB*, *algD* e *toxA* (96,8%).
- Observou-se a disseminação de um clone de *P. aeruginosa* contendo o gene *bla_{SPM}* com evidências indiretas da sua disseminação cruzada no nosso hospital, e policlonal daquelas contendo o gene *bla_{VIM}*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNELLO, M.; WONG-BERINGER, A. Differentiation in Quinolone Resistance by Virulence Genotype in *Pseudomonas aeruginosa*. **Plos One**, v. 7, n. 8, p. 1-8, 2012.

AL-DORZI, H. M.; EL-SAED, A.; RISHU, A. H.; BALKHY, H. H.; MEMISH, Z. A.; ARABI, Y.M. The results of a 6-year epidemiologic surveillance for ventilator-associated pneumonia at a tertiary care intensive care unit in Saudi Arabia. **American Journal of Infection Control**, v. 40, n. 9, p. 794-799, 2012.

ALOUSH, V.; NAVON-VENEZIA, S.; SEIGMAN-IGRA, Y.; CABILI, S.; CARMELI, Y. Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Risk Factors and Clinical Impact. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 1, p. 43-48, 2006.

ALP, E.; GUVEN, M.; YILDIZ, O.; AYGEN, B.; VOSS, A.; DOGANAY, M. Incidence, risk factors and mortality of nosocomial pneumonia in intensive care units: a prospective study. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 3, n. 17, p. 1-7, 2004.

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

APPELGREN, P.; HELLSTROM, I.; WEITZBERG, E.; SODERLUND, V.; BINDSLEV, L.; RANSJO, U. Risk factors for nosocomial intensive care infection: a long-term prospective analysis. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, v. 45, n. 6, p. 710-719, 2001.

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

BERGMANS, D. C. J. J.; BONTEN, M. J. M. Nosocomial Pneumonia. In: MAYHALL, C.G. **Hospital Epidemiology Infection Control**, 3^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams, cap. 22, p. 311-339, 2004.

BICUDO, D.; BATISTA, R.; FURTADO, G. H.; SOLA, A.; de MEDEIROS, E. A. S. Risk factors for catheter-related bloodstream infection: a prospective multicenter study in Brazilian intensive care units. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 4, p. 328-331, 2011.

BLEVES, S.; VIARRE, V.; SALACHA, R.; MICHEL, G.P.; FILLOUX, A.; VOULHOX, R. Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A wealth of pathogenic weapons. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, n. 8, p. 534-543, 2012.

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

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

BREINES, D.M.; QUABDESSELAMS, S.; NQ, E.Y.; TANKOVIC, J.; SHAH, S.; SOUSSY, C.J.; HOOPER, D.C. Quinolone resistance locus *nfxD* of *Escherichia coli* is a mutant allele of the *parE* gene encoding a subunit of topoisomerase IV. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.41, n. 1, p.175-179, 1997.

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

CARVALHO, R.H.; GONTIJO-FILHO, P.P. Epidemiologically relevant antimicrobial resistance phenotypes in pathogens isolated from critically ill patients in a Brazilian University Hospital. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39 ,n. 4 , p. 623-630, 2008.

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

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

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

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_{SPM} clone, spread in Hospitals in a Brazilian Amazon city. **Microbial Drug Resistance**, v. 13, n. 2, p. 142-146, 2007.

COBAN, A.Y.; NOHUT, O.K.; TANRIVERDI CAVCI, Y.; BAVRAMOGLU, G.; PIRINÇÇILER, M.; CETINKAVA, E.; CEKIÇ CIHAN, C.; BOZDOGAN, B.; DURUPINAR, B. Investigation of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in enterobacteriaceae: a multicenter study. **Mikrobiyologi Bulteni**, v. 46, n.3, p. 366-374, 2012.

COBAN, A.Y.; TANRIVERDI CAVCI, Y.; YILDIRIM, T.; ERTURAN, Z.; DURUPINAR, B.; BOZDOGAN, B. Investigation of plasmid-mediated quinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cystic fibrosis patient. **Mikrobiyologi Bulteni**, v. 45, n. 4, p. 602-608, 2011.

COLLIN, B. A.; LEATHER, H. L.; WINGARD, J. R.; RAMPHAL, R. Evolution, incidence, and susceptibility of bacterial bloodstream isolates from 519 bone marrow transplant patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, n. 7, p. 947–953, 2001.

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

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

EL-SOLH, A.A.; HATTEMER, A.; HAUSER, A.R.; ALHAJHUSAIN, A.; VORA, H. Clinical outcomes of type III *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. **Critical Care Medicine**, v. 40, n. 4, p. 1157-1163, 2012.

ERBAY, H.; YALCIN, A.N.; SERIN, S.; TURGUT, H.; TOMATIR, E.; CETIN, B.; ZENCIR, M. Nosocomial infections in intensive care unit in a Turkish university hospital: a 2-year survey. **Intensive Care Medicine**, v. 29, n. 9, p. 1482-1488, 2003.

FELTMAN, H.; SCHULERT, G.; KHAN, S.; JAIN, M.; PETERSON, L.; HAUSER, A. R. Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology**, v. 147, n.10, p. 2659-2669, 2001.

FILICE, G. A.; NYMAN, J. A.; LEXAU, C.; LEES, C. H.; BOCKSTEDT, L. A.; COMO-SABETTI, K.; LESHER, L. J.; LYNFIELD, R. Excess costs and utilization associated with methicillin resistance for patients with *Staphylococcus aureus* infection. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 31, n. 4, p. 365-373, 2010.

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

GALAN, J. E.; COLLMER, A. Type III Secretion Machines: Bacterial Devices for Protein Delivery into Host Cells. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1322-1328, 1999.

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

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

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

GAREY, K.W.; VO, Q.P.; LAROCCO, M.T.; GENTRY, L.O.; TAM, V.H. Prevalence of type III secretion protein exoenzymes and antimicrobial susceptibility patterns from bloodstream isolates of patients with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. **Journal of Chemotherapy**, v. 20, n. 6, p. 714-720, 2008.

GASINK, L.B.; FISHMAN, N.O.; WEINER, M.G.; NACHAMKIN, I.; BILKER, W.B.; LAUTENBACH, E. Fluoroquinolone-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Assessment of Risk Factors and Clinical Impact. **The American Journal of Medicine**, v. 119, n. 6, p. 526.e19-25, 2006.

GASPARETO, P. B.; MARTINS, A. F.; ZAVASCKI, A. P.; BARTH, A. L. Occurrence of bla_{SPM-1} and bla_{IMP-1} genes of metallo- β -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.

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

GUPTA, A.; KAPIL, A.; LODHA, R.; KABRA, S.K.; SOOD, S.; DHAWAN, B.; DAS, B.K.; SREENIVAS, V. Burden of healthcare-associated infections in a paediatric intensive care unit of a developing country: a single centre experience using active surveillance. **The Journal of Hospital Infection**, v. 78, n. 4, p. 323-326, 2011.

HAUSER, A. R.; COBB, E.; BODI, M.; MARISCAL, D.; VALLÉS, J.; ENGEL, J. N.; RELLO, J. Type III protein secretion is associated with poor clinical outcomes in patients with ventilator-associated pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. **Critical Care Medicine**, v. 30, n.3, p. 521-528, 2002.

HIGGINS, P.G.; FLUIT, A.C.; MILATOVIC, D.; VERHOEF, J.; SCHMITZ, F.J. Mutations in *GyrA*, *ParC*, *MexR* and *NfxB* in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 21, n.5, p. 409-413, 2003.

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

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

HSU, D. I.; OKAMOTO, M. P.; MURTHY, R.; WONG-BERINGER, A. Fluoroquinolone resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors for acquisition and impact on outcomes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, n.4, p. 535-541, 2005.

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

ITO, C.A.S.; GALES, A.C.; TOGNIM, M.C.B.; MUNERATO, P.; COSTA, M.D.C. Quinolone-Resistant *Escherichia coli*. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 12, n. 1, p. 5-9, 2008.

JABALAMELI, F.; MIRSALEHIAN, A.; KHORAMIAN, B.; ALIGHOLI, M.; KHORAMROOZ, S. S.; ASADOLLAHI, P.; TAHERIKALANI, M.; EMANEINI, M. Evaluation of biofilm production and characterization of genes encoding type III secretion system among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. **Burns**, v. 38, n. 8, p. 1192-1197, 2012.

JACOB, G. A. Mechanisms of resistance to quinolones. **Clinical Infection Disease**, v. 41, n.2, p. 120-126, 2005.

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

JAFFAR-BANDJEE, M.C.; LAZDUNSKI, A.; BALLY, M.; CARRÈRE, J.; CHAZALETTE, J.P.; GALABERT, C. Production of elastase, exotoxin A, and alkaline protease in sputa durin pulmonary exacerbation of cystic fibrosis in patients chronically infect by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 4, p. 924-929, 1995.

JALAL, S.; CIOFU, O.; HOIBY, N.; GOTOH, N.; WRETLIND, B. Molecular Mechanisms of Fluoroquinolone Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Cystic Fibrosis Patients. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n.3, p. 710-712, 2000.

JOO, E.J.; KANG, C.I.; HA, Y.E.; PARK, S.Y.; KANG, S.J.; WI, Y.M.; LEE, N.Y.; CHUNG, D.R.; PECK, K.R.; SONG, J.H. Impact of inappropriate empiric antimicrobial therapy on outcome in *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia: a stratified analysis according to sites of infection. **Infection**, v. 39, n. 4, p. 309-318, 2011.

JOSEPH, N. M.; SISTLA, S.; DUTTA, T. K.; BEADHE, A. S.; PARIJA, S.C.. Ventilator-associated pneumonia: role of colonizers and value of routine endotracheal aspirate cultures. **International Journal of Infection Disease**, v. 14, n. 8, p. 723-729, 2010.

KANG, C.I.; KIM, S.H.; KIM, H.B.; PARK, S.W.; CHOE, Y.J.; OH, M.D.; KIM, E.C.; CHOE, K.W. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: risk factors for mortality and influence of delayed receipt of effective antimicrobial therapy on clinical outcome. **Clinical Infectious Diseases**, v. 37, n. 6, p. 745–751, 2003.

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

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

KIPNIS, E.; SAWA, T.; WIENER-KRONISH, J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. **Médecine et Maladies Infectieuses**. v. 36, n. 2, p. 78-91, 2006.

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

KOLLEF, M.H. The importance of antimicrobial resistance in hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia. **Current Anaesthesia & Critical Care**, v. 16, n. 4, p. 209-219, 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.

LANOTTE, P.; WATT, S.; MEREGHETTI, L.; DARTIGUELONGUE, N.; RASTEGAR-LARI, A.; GOUDEAU, A.; QUENTIN, R. Genetic features of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients compared with those of isolates from other origins. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, n. Pt 1, p. 73-81, 2004.

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

LEE, J. K.; LEE, Y. S.; PARK, Y. K.; KIM, B.S. Alterations in the *GyrA* and *GyrB* subunits of topoisomerase II and the *ParC* and *ParE* subunits of topoisomerase IV in ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 25, n.4, p. 290-295, 2005.

LEIBOVICI, L.; SHRAGA, I.; DRUCKER, M.; KONIGSBERGER, H.; SAMRA, Z.; PITLIK, S. D. The benefit of appropriate empirical antibiotic treatment in patients with bloodstream infection. **Journal of Internal Medicine**, v. 244, n. 5, p. 379-386, 1998.

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

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

LUCENA, A.; DALLA COSTA, L.M.; NOGUEIRA, K.S.; MATOS, A.P.; GALES, A.C.; PAGANINI, M.C.; CASTRO, M.E.; RABONI, S.M. Nosocomial infections with metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: molecular epidemiology, risk factors, clinical features and outcomes. **The Journal of Hospital Infection**, 2014, doi: 10.1016/j.jhin.2014.05.007.

MAGIORAKOS, A.P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R.B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M.E.; GISKE, C.G.; HARBARTH, S.; HINDLER, J.F.; KAHLMETER, G.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; PATERSON, D.L.; RICE, L.B.; STELLING J.; STRUELENS, M.J.; VATOPOULOS, A.; WEBER, J.T.; MONNET, D.L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18,n. 3, p. 268–281, 2012.

MARRA, A. R.; CAMARGO, L. F.; PIGNATARI, A. C.; SUKIENNIK, T.; BEHAR, P. R.; MEDEIROS, E. A.; RIBEIRO, J.; GIRÃO, E.; CORREA, L.; GUERRA, C.; BRITES, C.; PEREIRA, C. A.; CARNEIRO, I.; REIS, M.; de SOUZA, M. A.; TRANCHESI, R.; BARATA, C. U.; EDMOND, M. B.; Brazilian SCOPE Study Group. Nosocomial Bloodstream Infections in Brazilian Hospitals: Analysis of 2, 563 Cases from a prospective Nationwide Surveillance Study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 5, p. 1866-1871, 2011.

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

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

MESAROS, N.; NORDMANN, P.; PLÉSIAT, P.; ROUSSEL-DELVALLEZ, M.; VAN ELDERE, J.; GLUPCZYNSKI, Y.; VAN LAETHEM, Y.; JACOBS, F.; LEBECQUE, P.; MALFROOT, A.; TULKENS, P. M.; VAN BAMBEKE, F. *Pseudomonas*

aeruginosa: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13, n. 6, p. 560-578, 2007.

MEYER, E.; JONAS, F.; SCHWAB, H.; RUEDEN, H.; GASTMEIER, P.; DASCHNER, F. D. Design of a Surveillance System of Antibiotic Use and Bacterial Resistance in German Intensive Care Units (SARI). **Clinical and Epidemiological Study**, v. 31, n. 4, p. 208-215, 2003.

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

MINARINI, L. A.; DARINI, A.L. Mutations in the quinolone resistance-determining regions of *gyrA* and *parC* in Enterobacteriaceae isolates from Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1309-1314, 2012.

MITT, P.; ADAMSON, V.; LOIVUKENE, K.; LANG, K.; TELLING, K.; PARO, K.; ROOM, A.; NAABER, P.; MAIMETS, M. Epidemiology of nosocomial bloodstream infections in Estonia. **The journal of Hospital Infection**, v. 71, n. 4, p. 365-370, 2009.

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

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

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

MOUNEIMNÉ, H.; ROBERT, J.; JARLIER, V.; CAMBAU, E. Type II topoisomerase mutations in ciprofloxacin resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 1, p. 62-66, 1999.

NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTION SURVEILLANCE (NNIS) SYSTEM REPORT, Data summary from January 1992 – June 2001, issued August 2001, American Journal of Infection Control, v. 29, n. 6, p. 404-421, 2001.

NEEDHAM, D.M.; BALANÇAS, D.C.; LAUPACIS, A.; PRONOVOST, P.J. A systematic review of the Charlson comorbidity index using Canadian administrative databases: a perspective on risk adjustment in critical care research. **Journal of Critical Care**, v. 20, n. 1, p. 12-19, 2005.

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

OLIVEIRA, A.C.; KOVNER, C.T.; SILVA, R.S. Nosocomial Infection in an Intensive Care Unit in a Brazilian University Hospital. **Revista Latino Americana de Enfermagem**, v. 18, n. 2, p. 233-239, 2010.

PALTANSING, S.; KRAAKMAN, M.E.; RAS, J.M.; WESSELS, E.; BERNARDS, A.T. Characterization of fluorquinolone and cephalosporin resistance mechanisms in Enterobacteriaceae isolated in a Dutch teaching hospital reveals the presence of an Escherichia coli ST131 clone with a specific mutation in *parE*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 1, p. 40-45, 2012.

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

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.

POOLE, K. Efflux-mediated Resistance to Fluorquinolones in Gram-negative bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n.9, p. 2233-2241, 2000.

PORTO, J.P.; SANTOS, R.O.; GONTIJO-FILHO, P.P.; RIBAS, R.M. Active surveillance to determine the impact of methicillin resistance on mortality in patients with bacteremia and influences of the use of antibiotics on the development of MRSA infection. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 6, p. 713-718, 2013.

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.

RELLO, J.; ALLEGRI, C.; RODRIGUEZ, A.; VIDAUR, L.; SIRGO, G.; GOMEZ, F.; AGBAHT, K.; POBO, A.; DIAZ, E. Risk factors for ventilator-associated pneumonia by *Pseudomonas aeruginosa* in presence of recent antibiotic exposure. **Anesthesiology**, v. 105, n. 4, p. 709-714, 2006.

ROBERTS, R. R.; SCOTT, R.D.; HOTA, B.; KAMPE, L.M.; ABBASI, F.; SCHABOWSKI, S.; AHMAD, I.; CIAVARELLA, G.G.; CORDELL, R.; SOLOMON, S.L.; HAGTVEDT, R.; WEINSTEIN, R.A. Costs attributable to healthcare-acquired infection in hospitalized adults and a comparison of economic methods. **Medical Care**, v. 48, n. 11, p. 1026–1035, 2010.

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.

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.80-85, 2008.

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

ROSENTHAL, V. D.; 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. 95-106, 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. 582-591, 2006.

ROY-BURMAN, A.; SAVEL, R.H.; RACINE, S.; SWANSON, B.L.; NEELAMBIKA, S.R.; FIJIMOTO, J.; SAWA, T.; FRANK, D.W.; WIENER-KRONISH, J.P. Type III Protein Secretion is Associated with Death in Lower Respiratory and Systemic *Pseudomonas aeruginosa* Infections. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 183, n. 12, p. 1767-1774, 2001.

RUIZ, J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA *gyrA*se protection. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 5, p. 1109-1117, 2003.

SADER, H.S.; JONES, R.N.; GALES, A.C.; SILVA, J.B.; PIGNATARI, A.C.; SENTRY Participants Group (Latin America). SENTRY antimicrobial surveillance

program report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n.1, p. 25-79, 2004.

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

SADER, H.S.; REIS, A.O.; SILBERT, S.; GALES, A.C. IMPs, VIMs and SPMs: the diversity of metallo- β -lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian hospital. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 11, n. 1, p. 73-76, 2005.

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

SALABI, A.E.; TOLEMAN, M.A.; WEEKS, J.; BRUDERER, T.; FREI, R.; WALSH, T.R. First report of the metallo-beta-lactamase SPM-1 in Europe. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 1, p. 582, 2010.

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.

SATO, H.; FRANK, D. W. *ExoU* is a potent intracellular phospholipase. **Molecular Microbiology**, v.53, n. 5, p. 1279-1290, 2004.

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, p. 367-371, 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.

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

SUAREZ, C.; PENA, C.; GAVALDA, L.; TUBAU, F.; MANZUR, A.; DOMINGUEZ, M.A.; PUJOL, M.; GUDIOL, F.; ARIZA, J. Influence of carbapenem resistance on mortality and the dynamics of mortality in *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection. **International Journal of Infectious Diseases**, 14 Suppl 3, e73-78, 2010.

TAO, L.; HU, B.; ROSENTHAL, V.D.; ZHANG, Y.; GAO, X.; HE, L. Impact of a multidimensional approach on ventilator-associated pneumonia rates in a hospital of Shanghai: Findings of the International Nosocomial Infection Control Consortium. **Journal of Critical Care**, v. 27, n. 5, p. 440-446, 2012.

TEJADA, A. A.; BELLO, D. S.; CHACÓN, V.E.; MUÑOZ, M.J.; VILLUENDAS, U.M.C.; FIGUERAS, P.; SUAREZ, F.J.; HERNÁNDEZ, A. Risk factors for nosocomial pneumonia in critically ill trauma patients. **Critical Care Medicine**, v. 29, n. 2, p. 304-309, 2001.

TEJERINA, E.; FRUTOS-VIVAR, F.; RESTREPO, M. I; ANZUETO, A.; ABROUG, F.; PALIZAS, F.; GONZÁLEZ, M.; D'EMPAIRE, G.; APEZTEGUÍA, C.; ESTEBAN, A. Incidence, risk factors, and outcome of ventilator-associated pneumonia. **Journal of Critical Care**, v. 21, n. 1, p. 56-65, 2006.

TODAR, K. *Pseudomonas aeruginosa*. **Todar's Online Textbook of Bacteriology**. University of Wisconsin-Madison. Department of Bacteriology, 2004 Disponível em: <http://textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html>.

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.

TOUFEN JUNIOR, C.; HOVNANIAN, A.L.D.; FRANCA, S.A.; CARVAHO, C.R.R. Prevalence rates of infection in intensive care units of a tertiary teaching hospital. **Revista do Hospital das Clínicas**, v. 58, n. 5, p. 254-259, 2003.

TSENG, C. C; LIU, S.F.; WANG, C.C; TU, M.L.; CHUNG, Y.H.; LIN, M.C.; FANG, W. F. Impact of clinical severity index, infective pathogens, and initial empiric antibiotic use on hospital mortality in patients with ventilator-associated pneumonia. **American Journal of Infection Control**, v. 40, n. 7, p. 648-652, 2012.

VAN DER BIJ, A.K.; VAN DER ZWAN, D.; PEIRANO, G.; SEVERIN, J.A.; PITOUT, J.D.; VAN WESTREENEN, M.; GOESSENS, W.H. Metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the Netherlands: the nationwide emergence of a single sequence type. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 9, p. E369-372, 2012.

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

VANCE, R. E.; RIETSCH, A.; MEKALANOS, J.J. Role of the type III secreted exoenzymes S, T, and Y in systemic spread of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in vivo. **Infection and Immunity**, v. 73, n.3, p. 1706-1713, 2005.

VIALE, P.; GIANNELLA, M.; LEWIS, R.; TRECARICHI, E.M.; PETROSILLO, N.; TUMBARELLO, M. Predictors of mortality in multidrug-resistant *Klebsiella pneumonia* bloodstream infections. **Expert Review of anti-infective therapy**, v. 11, n. 10, p. 1053-1063, 2013.

VINCENT, J. L. Nosocomial Infections in Adult Intensive-Care Units. **The Lancet**, v. 361, n. 9374, p. 2068-77, 2003.

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

WALSH, T. R.; TOLEMAN, M. A.; 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.; HOIBY, N. Class A carbapenemases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, n. 3, p. 470-482, 2007.

WAREHAM, D.W.; CURTIS, M.A. A genotypic and phenotypic comparison of type III secretion profiles of *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis and bacteremia isolates. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 297, n. 4, p. 227-234, 2007.

WARREN, D.K.; ZACK, J.E.; ELWARD, A.M.; COX, M.J.; FRASER, V.J. Nosocomial primary bloodstream infections in intensive care unit patients in a nonteaching community medical center: a 21-month prospective study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, n. 8, p. 1329-1335, 2001.

WILKE, M.H. Multiresistant bacteria and current therapy- the economical side of the story. **European Journal of Medical Research**, v. 15, n. 12, p. 571-576, 2010.

WISPLINGHOFF, H.; BISCHOFF, T.; TALLENT, S.M.; SEIFERT, H.; WENZEL, R.P. Nosocomial Bloodstream Infections in US Hospitals: Analysis of 24,179 Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, n. 3, p. 309-317, 2004.

WONG-BERINGER, A.; WIENER-KRONISH, J.; LYNCH, S.; FLANAGAN, J. Comparison of type III secretion system virulence among fluoroquinolone-susceptible and -resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 14, n. 4, p. 330-336, 2008.

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

XAVIER, D.E.; PICAIO, R.C.; GIRARDELLO, R.; FEHLBERG, L.C.C.; GALES, A.A. Efflux pumps expression and its association with porin down-regulation and β -lactamase production among *Pseudomonas aeruginosa* causing bloodstream infections in Brazil. **BMC Microbiology**, v.10, 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- β -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.O.; GASPARETO, P.B.; MARTINS, A.F.; GONCALVES, A.L.; BARTH, A.L. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo- β -lactamase in a teaching hospital in southern Brazil. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 56, n. 6, p. 1148-1151, 2005.

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

FICHA INDIVIDUAL DE VIGILÂNCIA – Bacteremia e PAV por *Pseudomonas aeruginosa*

Nome: _____ Gênero _____

PRT.: _____ UTI: ____ Clínica ____ Leito: _____ Idade: _____

Internação hospitalar: _____ Alta Hospitalar: _____ Evolução _____

Internação UTI: _____ Alta UTI: _____

Diagnóstico Hospitalar:

Diagnóstico UTI: _____

Ventilação Mecânica: Início _____ Fim _____

Pneumonia () Bacteremia ()

Dispositivos Invasivos:

() Traqueostomia () CVC () SNG/SNE () SVD () NP

Comorbidades: _____

Antibioticoterapia:

Antibiótico	Início	Fim

Cirurgia: _____ Data _____

Etiologia: _____ Data de isolamento _____

Perfil de Resistência: _____

CPIS: Data: _____

Temperatura: () 0-36,5 – 38,4 () 1 – 38,5-38,9 () 2- ≥ 39,0 ou ≤ 36,0

Leucócitos: () 0 – 4.000 -11.000 () 1- < 4.000 ou >11.000 () 2- Bastonetes ≥500 () Desvio a esquerda

Secreção: () 0- < 14+ () 1- ≥ 14+ () 2- purulenta - Oxigenação: PaO2 ____ FiO2 ____

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

Cultura: () 0- <106 () 1- >106 () 2- Gram

ANEXO II

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.

ANEXO III

Universidade Federal de Uberlândia/MG

PROJETO DE PESQUISA

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

Área Temática:

Pesquisador: Rosineide Marques Ribas

Versão: 2

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia/ UFU/ MG

CAAE: 00763112.7.0000.5152

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 47897

Data da Relatoria: 15/06/2012

Apresentação do Projeto:

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

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

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

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

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

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

ANEXO IV

Paulo Gontijo Filho

De: "Agropave Ltda" <agropave@terra.com.br>
 Para: <gontijofilho@ufu.br>
 Enviada em: segunda-feira, 14 de novembro de 2011, 10:59
 Anexo: 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 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

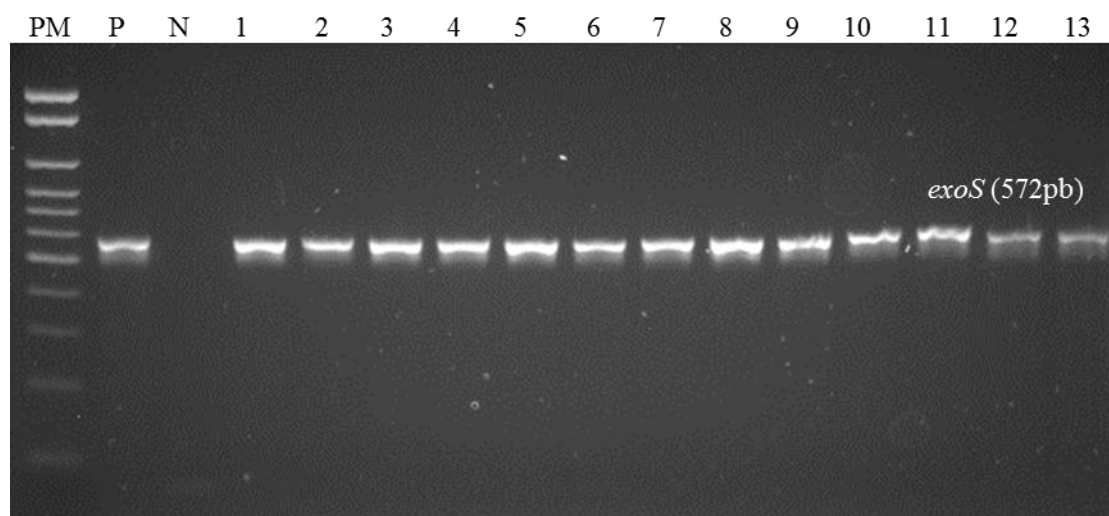
OBS.: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 10 de novembro de 2011.

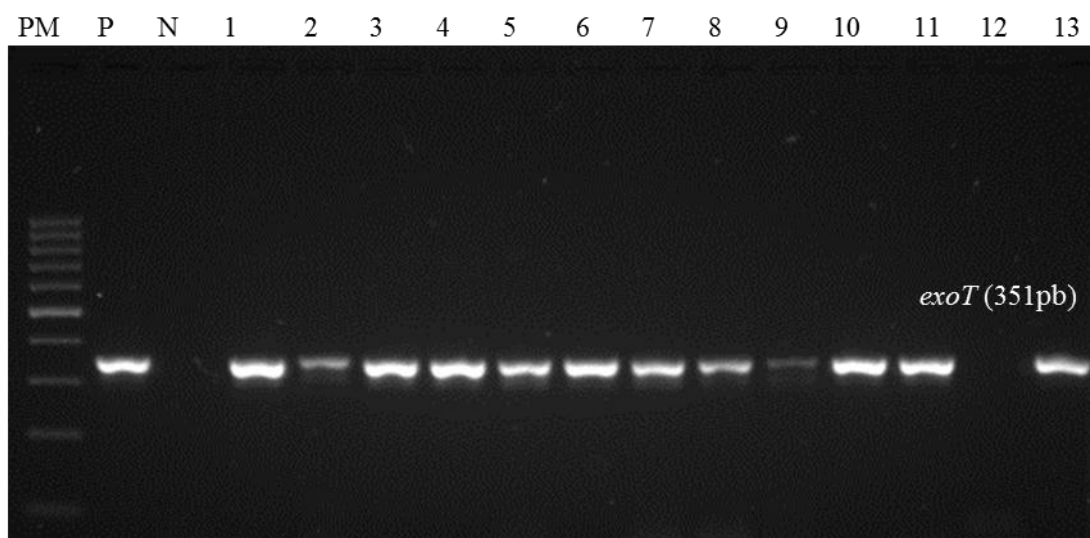
Prof. Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado
 Coordenadora do CEP/UFU

16/11/2011

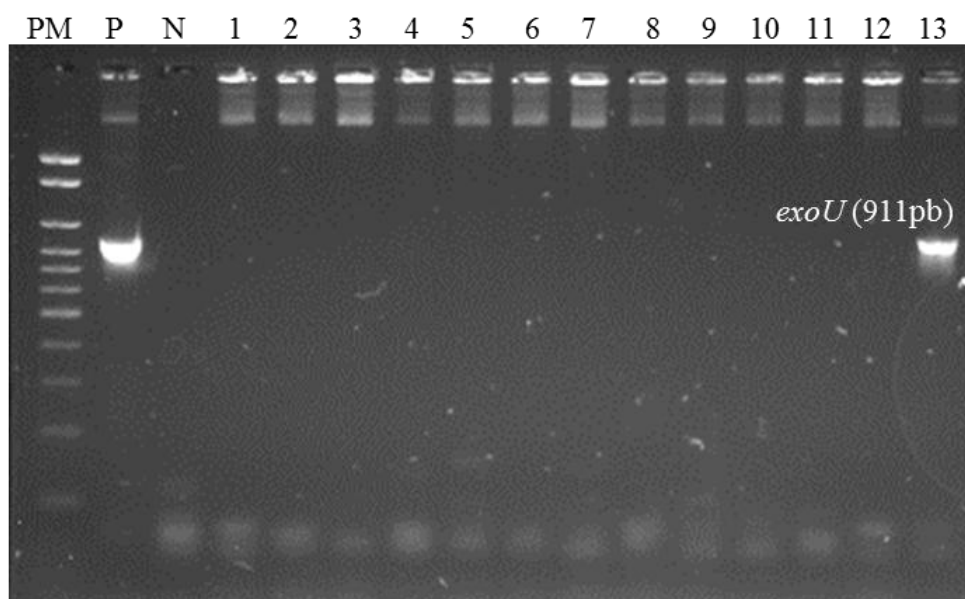
ANEXO V



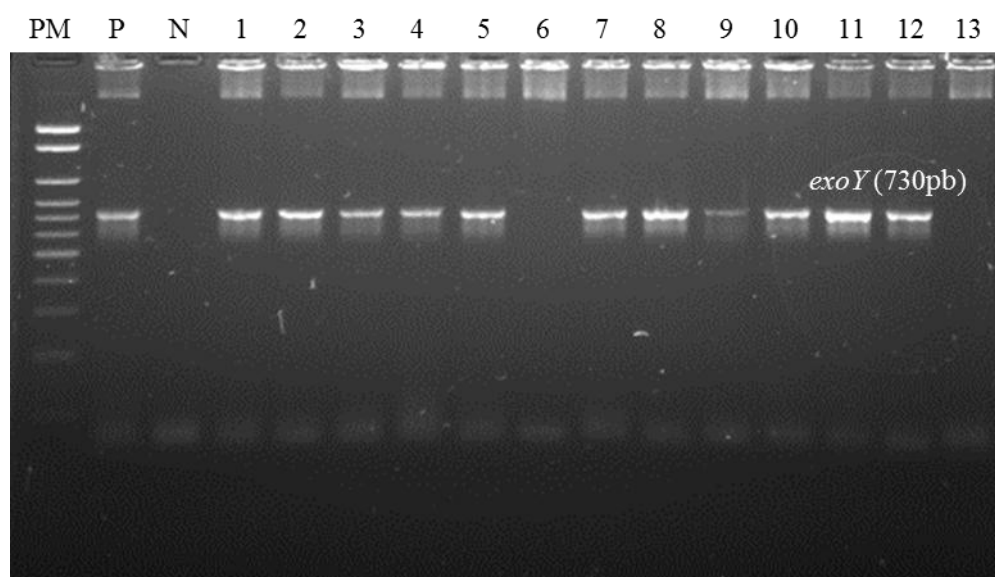
ANEXO V - Figura 1: Eletroforese em gel de agarose para detecção do gene *exoS* nas amostras de *Pseudomonas aeruginosa* recuperadas de sangue e aspirado traqueal (gel ilustrativo, indicando apenas parte das amostras testadas). PM: Marcador de peso molecular 100pb; P: Controle positivo PAO1; N: Controle Negativo (tubo sem DNA); 1 a 13: Amostras de *Pseudomonas aeruginosa* testadas.



ANEXO V - Figura 2: Eletroforese em gel de agarose para detecção do gene *exoT* nas amostras de *Pseudomonas aeruginosa* recuperadas de sangue e aspirado traqueal (gel ilustrativo, indicando apenas parte das amostras testadas). PM: Marcador de peso molecular 100pb; P: Controle positivo PAO1; N: Controle Negativo (tubo sem DNA); 1 a 13: Amostras de *Pseudomonas aeruginosa* testadas.

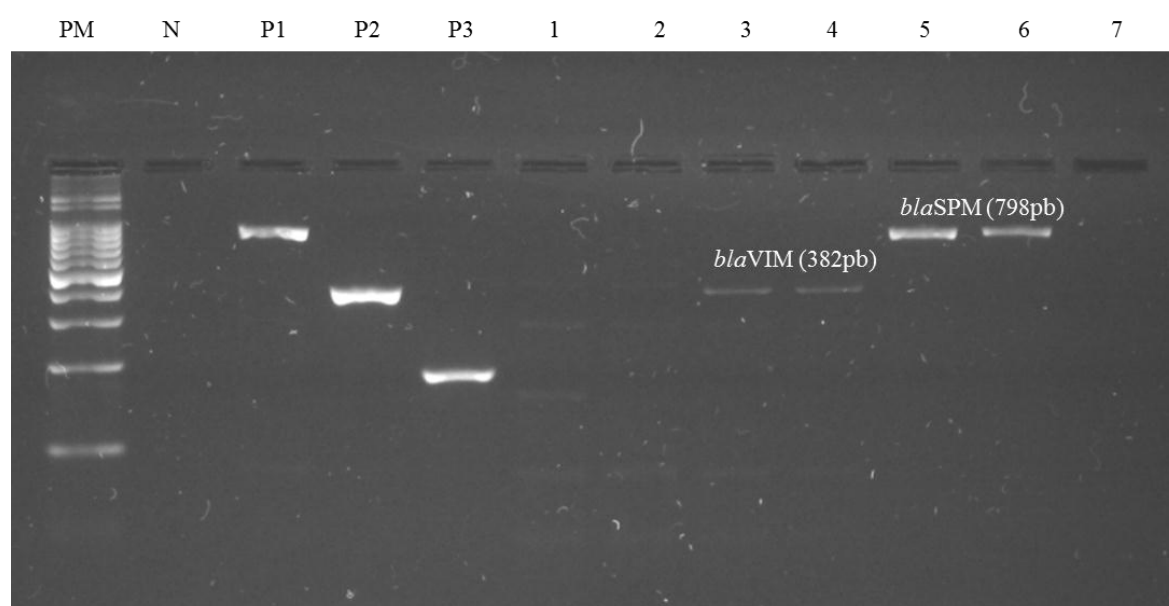


ANEXO V - Figura 3: Eletroforese em gel de agarose para detecção do gene *exoU* nas amostras de *Pseudomonas aeruginosa* recuperadas de sangue e aspirado traqueal (gel ilustrativo, indicando apenas parte das amostras testadas). PM: Marcador de peso molecular 100pb; P: Controle positivo PA103; N: Controle Negativo (tubo sem DNA); 1 a 13: Amostras de *Pseudomonas aeruginosa* testadas.



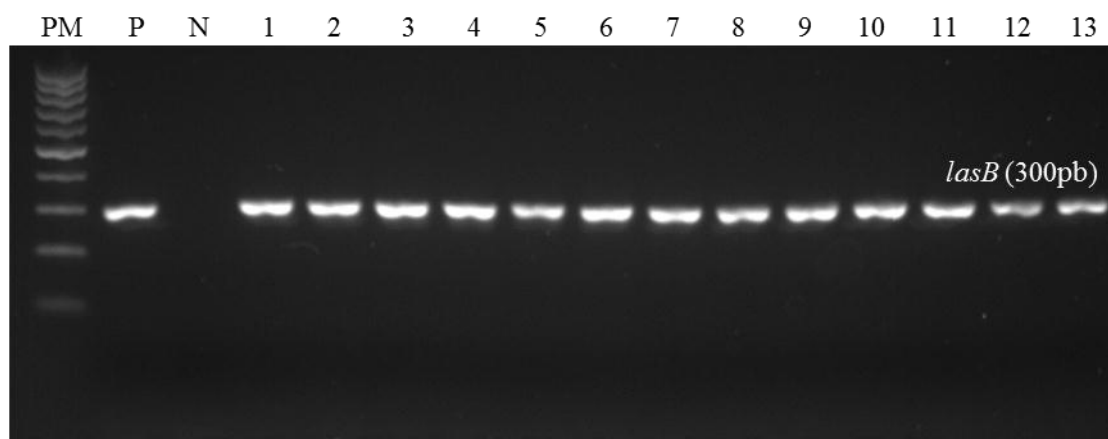
ANEXO V - Figura 4: Eletroforese em gel de agarose para detecção do gene *exoY* nas amostras de *Pseudomonas aeruginosa* recuperadas de sangue e aspirado traqueal (gel ilustrativo, indicando apenas parte das amostras testadas). PM: Marcador de peso molecular 100pb; P: Controle positivo PAO1; N: Controle Negativo (tubo sem DNA); 1 a 13: Amostras de *Pseudomonas aeruginosa* testadas.

ANEXO VI

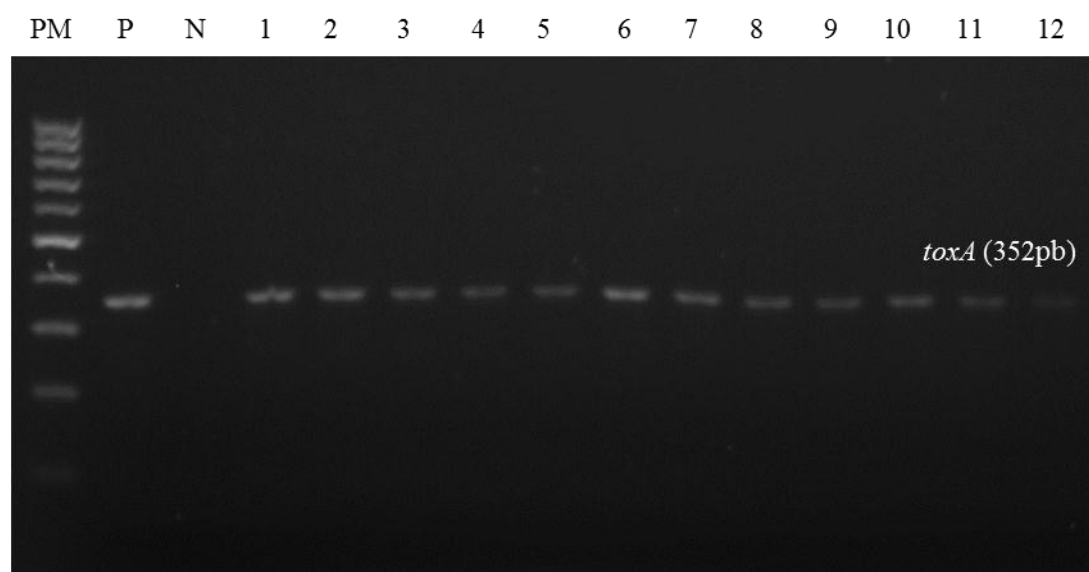


ANEXO VI - Figura 1: Eletroforese em gel de agarose para detecção dos genes produtores de metalo- β -lactamases nas amostras de *Pseudomonas aeruginosa* recuperadas de sangue e aspirado traqueal (gel ilustrativo, indicando apenas parte das amostras testadas). PM: Marcador de peso molecular 100pb; N: Controle Negativo (tubo sem DNA); P1: Controle positivo para *bla_{SPM}* *P. aeruginosa* 48-1997; P2: Controle positivo para o gene *bla_{VIM}* *P. aeruginosa* A1254; P3: Controle positivo para o gene *bla_{IMP}* *P. aeruginosa* 101-4704; 1 a 7: Amostras de *Pseudomonas aeruginosa* testadas.

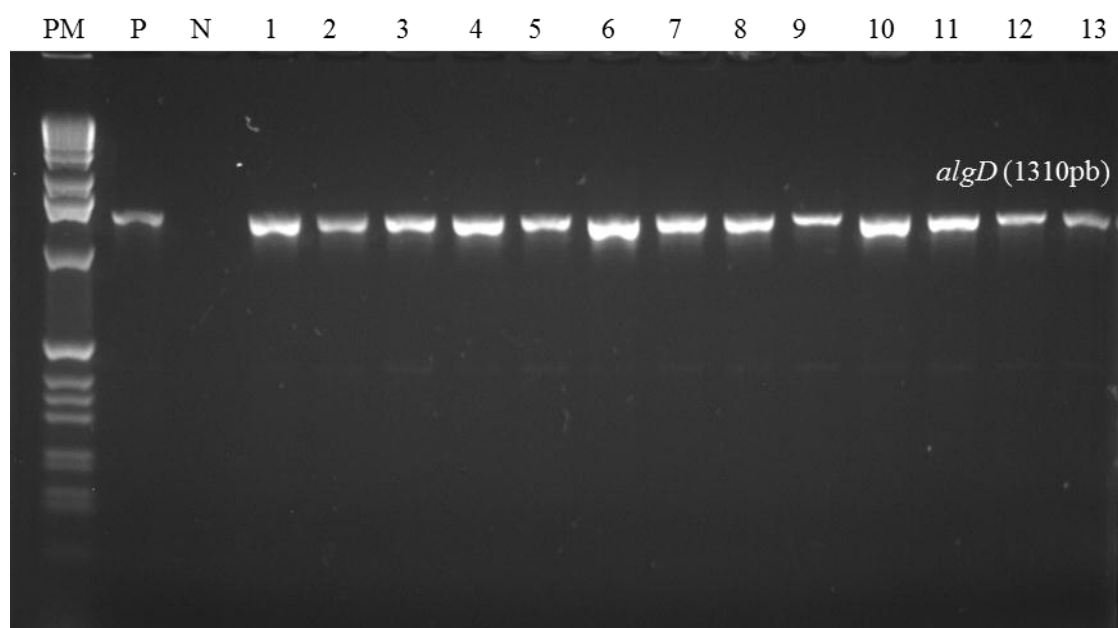
ANEXO VII



ANEXO VII – Figura 1: Eletroforese em gel de agarose para detecção do gene *lasB* nas amostras de *Pseudomonas aeruginosa* recuperadas de sangue e aspirado traqueal (gel ilustrativo, indicando apenas parte das amostras testadas). PM: Marcador de peso molecular 100pb; P: Controle positivo PAO1; N: Controle Negativo (tubo sem DNA); 1 a 13: Amostras de *Pseudomonas aeruginosa* testadas.



ANEXO VII – Figura 2: Eletroforese em gel de agarose para detecção do gene *toxA* nas amostras de *Pseudomonas aeruginosa* recuperadas de sangue e aspirado traqueal (gel ilustrativo, indicando apenas parte das amostras testadas). PM: Marcador de peso molecular 100pb; P: Controle positivo PAO1; N: Controle Negativo (tubo sem DNA); 1 a 12: Amostras de *Pseudomonas aeruginosa* testadas.



ANEXO VII – Figura 3: Eletroforese em gel de agarose para detecção do gene *algD* nas amostras de *Pseudomonas aeruginosa* recuperadas de sangue e aspirado traqueal (gel ilustrativo, indicando apenas parte das amostras testadas). PM: Marcador de peso molecular 100pb; P: Controle positivo PAO1; N: Controle Negativo (tubo sem DNA); 1 a 13: Amostras de *Pseudomonas aeruginosa* testadas.