

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

**Epidemiologia e caracterização molecular de *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* multirresistentes carreando determinantes de resistência às quinolonas mediada por plasmídeos**

Bruna Fuga Araújo

Uberlândia  
Janeiro – 2016

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

**Epidemiologia e caracterização molecular de *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* multirresistentes carreando determinantes de resistência às quinolonas mediada por plasmídeos**

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

Bruna Fuga Araújo  
Prof. Dr. Paulo Pinto Gontijo-Filho (orientador)  
Profa. Dra. Rosineide Marques Ribas (co-orientadora)

Uberlândia  
Janeiro – 2016

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

---

A663e  
2016

Araújo, Bruna Fuga, 1991

Epidemiologia e caracterização molecular de *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* multirresistentes carreando determinantes de resistência às quinolonas mediada por plasmídeos / Bruna Fuga Araújo. - 2016.  
102 f. : il.

Orientador: Paulo Pinto Gontijo Filho.

Coorientadora: 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. *Pneumonia* - Teses. I. Gontijo Filho, Paulo Pinto. II. Ribas, Rosineide Marques. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

---

CDU: 612.017



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



Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Bruna Fuga Araújo**

“Epidemiologia e caracterização molecular de *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* multirresistentes carreando determinantes de resistência às quinolonas mediada por plasmídeos”

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, 19 de fevereiro de 2016.

Prof.ª Dra. Kátia Regina Netto dos Santos – UFRJ

Prof.ª Dra. Raquel Cristina C. Dantas – UFU/PATOS DE MINAS

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

Dedico esta conquista aos meus pais  
Ivani Fuga Araújo e Luiz Carlos Araújo  
Por todo esforço e confiança a mim depositada.  
Meu amor, carinho e eterna gratidão a vocês.

***“A mente que se abre a uma nova ideia, jamais voltará ao seu tamanho original.”***

**(Albert Einstein)**

## AGRADECIMENTOS

À **Deus**, que me proporcionou oportunidades incríveis e me acalentou em momentos difíceis, mostrou-me o caminho nas horas incertas e supriu minhas necessidades.

Aos meus pais **Ivani** e **Luiz Carlos**, pela confiança, apoio, companheirismo e exemplo de determinação. Espero que esta etapa, que agora termino, possa de alguma forma, retribuir e compensar todo o carinho, apoio e dedicação que, constantemente, me oferecem.

Aos meus *familiares* pelo apoio incondicional.

Ao meu namorado **Paulo Augusto R. Rosa**, por sua torcida e incentivo, e por fazer meus dias mais leves e felizes.

Ao Professor Dr. **Paulo P. Gontijo Filho**, agradeço a oportunidade e o privilégio da sua orientação, sua contribuição para o meu desenvolvimento, por sua confiança, disponibilidade, dedicação e exemplo. Muito Obrigada!

À Professora Dra. **Rosineide Marques Ribas**, pela co-orientação, e valiosas contribuições para o aprimoramento deste trabalho. Obrigada por todo incentivo, paciência, confiança e carinho. Minha eterna gratidão!

Aos queridos *amigos*, especialmente, **Paola, Sabrina Royer, Melina, Iara, Raquel, Deivid, Daiane, Eliézer, Sabrina Melo, Nathâny e Maria Teresa**, pela companhia, apoio, carinho, e toda alegria vivenciada, com vocês os dias difíceis se tornaram mais doces e os caminhos menos árduos.

Às Técnicas do Laboratório de Microbiologia Molecular (UFU) **Cristiane** e **Lícia**, que auxiliaram para além de apoio técnico, com carinho e atenção para que fosse possível a execução do trabalho no laboratório.

Ao Prof. Dr. **Jonny Yokosawa** e a técnica **Thelma F. M. S. Oliveira** do Laboratório de Virologia (UFU), e a Profa. Dra. **Daise Aparecida Rossi** do Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada (UFU), pela disponibilidade e suporte técnico.

Às professoras Dra. **Silvia Dias Oliveira** (PUCRS), Dra. **Márcia Maria Camargo Moraes** (UPE) e Dra. **Magna Cristina de Paiva** (UFSJ), pela gentileza em ceder as amostras controle utilizadas neste trabalho.

Às professoras Profa. Dra. **Kátia Regina Netto dos Santos** (UFRJ), Profa. Dra. **Raquel Cristina Cavalcanti Dantas** (UFU) e Profa. Dra. **Karinne Spirandelli Carvalho Naves** (UFU), por aceitarem participar da banca de Mestrado e pelas contribuições que darão ao trabalho.

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

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

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

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico** (CNPq) 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 .....	9
LISTA DE FIGURAS .....	11
LISTA DE TABELAS .....	12
RESUMO .....	14
ABSTRACT .....	15
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. OBJETIVOS .....	23
2.1. Objetivo geral .....	23
2.2. Objetivos específicos.....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1. Hospital .....	24
3.2. Desenho do estudo .....	24
3.3. Definições.....	25
3.4. Amostras bacterianas.....	27
3.5. Identificação das espécies e teste de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	27
3.6. Armazenamento das bactérias .....	28
3.7. Técnicas moleculares .....	28
3.7.1. Extração do DNA plasmidial .....	28
3.7.2. Caracterização dos genes Integron de Classe I.....	29
3.7.3. Caracterização dos genes de resistência aos carbapenêmicos .....	29
3.7.4. Caracterização dos genes PMQR.....	30
3.7.5. Sequenciamento dos fragmentos de DNA amplificados ( <i>qnrS</i> e <i>aac(6')-Ib</i> ).....	32
3.7.6. Tipagem molecular pela técnica de Eletroforese em Campo Pulsado.....	32
3.8. Análise estatística.....	34
3.9. Comitê de Ética .....	34
4. RESULTADOS .....	35
4.1. Vigilância I: Infecções por <i>P. aeruginosa</i> resistentes às fluoroquinolonas e/ou carbapenêmicos .....	35
4.2. Vigilância II: Infecções por <i>K. pneumoniae</i> e <i>E. coli</i> resistentes às fluoroquinolonas.....	51
5. DISCUSSÃO.....	69
5.1. Estudo epidemiológico-molecular de infecções por <i>P. aeruginosa</i> resistentes às fluoroquinolonas e/ou carbapenêmicos .....	69
5.2. Estudo epidemiológico-molecular de infecções por <i>K. pneumoniae</i> e <i>E. coli</i> resistentes às fluoroquinolonas.....	72
6. CONCLUSÕES .....	77
7. REFERÊNCIAS .....	78
APÊNDICE A .....	98
APÊNDICE B.....	99
APÊNDICE C.....	100
ANEXO A .....	101
ANEXO B .....	102

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

< Menor

> Maior

≤ Menor ou igual

≥ Maior ou igual

μg Microgramas

μL Microlitros

**ATCC** *American Type Culture Collection*

**BGN** Bacilo Gram-negativo

**BHI** *Brain Heart Infusion*

**CDC** *Centers for Disease Control and Prevention*

**CLSI** *Clinical and Laboratory Standards Institute*

**ESBL** Betalactamases de Espectro Ampliado

**et al.** E colaboradores

**HC-UFU** Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia

**IC** Intervalo de confiança

**IRAS** Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde

**KPC** *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

**MDR** Multirresistente

**MIC** *Minimum Inhibitory Concentration*

**mL** Mililitro

**mM** Milimolar

**MβL** Metallo-β-lactamase

**NHSN** *National Healthcare Safety Network*

**OR** *Odds Ratio* – Razão de possibilidades

**PAV** Pneumonia associada à ventilação mecânica

**Pb** *base pair*, par de base

**PCR** *Polymerase Chain Reaction*

**PFGE** *Pulsed Field Gel Electrophoresis*

**Pmol** Picomol

**PMQR** *Plasmid-mediated quinolone resistance*

**QRDR** Região Determinante de Resistência a Quinolonas

**SENTRY** *SENTRY Antimicrobial Surveillance Program*

**ST** *Sequence Type*

**TBE** Tris borato EDTA 12

**TE** Tris, EDTA e água

**TSA** *Trypticase Soy Agar*

**TSB** *Trypticase Soy Broth*

**UFC/mL** Unidade Formadora de Colônia / mililitro

**UTI** Unidade de Terapia Intensiva

**β** Beta

**χ<sup>2</sup>** Qui-quadrado

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Organograma da população estudada: infecções por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ....	35
<b>Figura 2</b> - Curva de sobrevivência dos pacientes com infecções por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> que receberam terapia antimicrobiana inapropriada em relação àqueles que receberam terapia antimicrobiana apropriada.....	40
<b>Figura 3</b> - Dendrograma dos perfis de <i>Pulsed-field Gel Electrophoresis</i> (PFGE), e de resistência das amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	51
<b>Figura 4</b> - Organograma da população estudada: infecções por <i>Klebsiella pneumoniae</i> e <i>Escherichia coli</i> .....	52
<b>Figura 5</b> - Dendrograma dos perfis de <i>Pulsed-field Gel Electrophoresis</i> (PFGE), e de resistência das amostras de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	67
<b>Figura 6</b> - Dendrograma dos perfis de <i>Pulsed-field Gel Electrophoresis</i> (PFGE), e de resistência das amostras de <i>Escherichia coli</i> .....	68
<b>Figura Suplementar 1</b> - Organograma da população estudada.....	98

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Linhagens controle utilizadas em cada experimento.....	27
<b>Tabela 2</b> - <i>Primers</i> para detecção dos genes codificadores de integron de classe 1 em amostras de <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	29
<b>Tabela 3</b> - <i>Primers</i> para detecção dos genes codificadores de metalo- $\beta$ -lactamases em <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	30
<b>Tabela 4</b> - <i>Primers</i> para detecção dos genes PMQR em amostras de <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	31
<b>Tabela 5</b> - Características dos pacientes, mortalidade e fatores de risco independentemente associados com infecções por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> multirresistentes.....	37
<b>Tabela 6</b> - Terapia antimicrobiana e evolução clínica de pacientes com bacteremia causada por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente aos carbapenêmicos, fluoroquinolonas e multirresistentes.....	41
<b>Tabela 7</b> - Terapia antimicrobiana e evolução clínica de pacientes com PAV causada por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente aos carbapenêmicos, fluoroquinolonas e multirresistentes.....	43
<b>Tabela 8</b> - Frequência de episódios de infecção e de pacientes com infecções por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , no HC-UFU, no período de 2009-2012 e 2014.....	45
<b>Tabela 9</b> - Perfis de resistência entre 242 amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	46
<b>Tabela 10</b> - Caracterização de 40 amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistentes às fluoroquinolonas e/ou carbapenêmicos em relação à concentração inibitória mínima, genes <i>bla<sub>SPM</sub></i> , <i>bla<sub>VIM</sub></i> , <i>qnrS</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>aac(6')-Ib<sub>7</sub></i> , <i>intI</i> , e pulsotipos obtidos por PFGE.....	48
<b>Tabela 11</b> - Características demográficas, clínicas e mortalidade de 115 pacientes com infecção hospitalar ou comunitária por <i>Klebsiella pneumoniae</i> ou <i>Escherichia coli</i> atendidos no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.....	54

<b>Tabela 12</b> - Terapia antimicrobiana apropriada ou inapropriada e evolução clínica de pacientes com infecções hospitalares por amostras de <i>Klebsiella pneumoniae</i> ou <i>Escherichia coli</i> resistentes às fluoroquinolonas.....	56
<b>Tabela 13</b> - Frequência de amostras de origem hospitalar e comunitária recuperados de pacientes com infecção por <i>Klebsiella pneumoniae</i> ou <i>Escherichia coli</i> resistentes às fluoroquinolonas, de diferentes espécimes clínicos e unidades do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.....	57
<b>Tabela 14</b> - Episódios de infecções por amostras de <i>Klebsiella pneumoniae</i> ou <i>Escherichia coli</i> recuperadas de infecções urinárias hospitalares ou comunitárias.....	60
<b>Tabela 15</b> - Perfis de resistência aos antimicrobianos de amostras de <i>Klebsiella pneumoniae</i> e <i>Escherichia coli</i> resistentes às fluoroquinolonas.....	61
<b>Tabela 16</b> - Caracterização de 40 micro-organismos da família <i>Enterobacteriaceae</i> resistentes às fluoroquinolonas, em relação à concentração inibitória mínima, genes PMQR/ <i>aac(6')-Ib</i> , <i>intI</i> , e pulsotipos do PFGE.....	64
<b>Tabela Suplementar 1</b> - Características de 40 amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistentes às fluoroquinolonas.....	99
<b>Tabela Suplementar 2</b> - Características de 20 amostras de <i>Klebsiella pneumoniae</i> e de 20 amostras de <i>Escherichia coli</i> resistentes às fluoroquinolonas.....	100

## RESUMO

O estudo realizado foi abrangente incluindo aspectos de epidemiologia clássica e molecular de infecções por *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* resistentes às fluoroquinolonas e/ou carbapenêmicos. A análise molecular incluiu a determinação do perfil clonal, identificação de genes de interesse através de ensaios baseados em PCR e sequenciamento de genes alvo. Um estudo caso-controle foi realizado para avaliar o prognóstico e o impacto da terapia inapropriada nos pacientes com bacteremia e PAV (Pneumonia associada à ventilação mecânica), bem como para a determinação dos fatores de risco associados às infecções por *P. aeruginosa* multirresistente (MDR). Observou-se frequência elevada de amostras de *P. aeruginosa* MDR (40,7%), sendo 51,0% dos isolados independentemente associados com terapia antimicrobiana inapropriada. Em pacientes com PAV, frequências significantes foram relacionadas à terapia inapropriada, principalmente quando por amostras MDR e resistentes às fluoroquinolonas. Além disso, bacteremia foi detectada em 66,9% dos pacientes, e o tempo de internação hospitalar foi mais prolongado quando as infecções foram por amostras resistentes às fluoroquinolonas. Determinantes de resistência às quinolonas mediada por plasmídeo (PMQR) foram detectados em duas (5,3%) amostras hospitalares de *P. aeruginosa* (*qnrS*<sub>1</sub> e *aac*(6')*Ib-cr*), enquanto que naqueles de *K. pneumoniae* e *E. coli* hospitalares ou comunitários a presença desse gene foi mais alta (55,3%; *qnrA*, *qnrB*, *qnrD*, *qnrS* e *aac*(6')*Ib-cr*). Adicionalmente, foi possível verificar a presença da variante *aac*(6')-*Ib*<sub>7</sub>, com frequência expressiva para aqueles de *P. aeruginosa*. Independentemente da presença de genes PMQR as concentrações inibitórias mínimas (CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub>) para ciprofloxacina foram elevadas, assim como uma alta frequência de amostras MDR, e aqueles da família *Enterobacteriaceae* foram principalmente agentes de infecções comunitárias (55,0%) e do trato urinário (72,9%). A maioria das amostras (90%) apresentou integron de classe 1, mas há necessidade de mais investigações para determinar sua relação com genes PMQR. Houve a detecção de genes que codificam metalo-β-lactamases em *P. aeruginosa* em 21,9% das amostras, com predominância de *bla*<sub>SPM</sub>, e de um perfil policlonal. Além disso, não houve um clone prevalente associado à presença dos determinantes PMQR. Os nossos dados revelam pela primeira vez a presença de determinantes PMQR em amostras clínicas de *P. aeruginosa* no Brasil, e uma frequência elevada de pacientes com terapia inapropriada; e, de amostras de *K. pneumoniae* e *E. coli* multirresistentes, com resistência às fluoroquinolonas mediada por genes plasmidiais. Embora os estudos de epidemiologia clássica e molecular nos hospitais sejam de grande importância no país, é necessário que práticas de controle de infecção resultem na redução destas infecções com base nos mesmos considerando a carga adicional representada pela participação de micro-organismo MDR, e sua importância em termos de morbidade, mortalidade e custos.

**Palavras-chave:** Resistência às quinolonas mediada por plasmídeo (do inglês *Plasmid-mediated quinolone resistance*, PMQR); Metalo-β-lactamase (MBL); Multirresistência; *P. aeruginosa*; *K. pneumoniae*; *E. coli*.

## ABSTRACT

The study conducted was comprehensive, including classical epidemiology and molecular aspects of infections by *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* and *E. coli* resistant to fluoroquinolones and/or carbapenems. Molecular analysis included determining the profile clonal, identification of genes of interest by PCR-based assays and sequencing of target gene. Case-control study was conducted to evaluate the prognostic and the impact of inappropriate therapy in patients with bacteremia and VAP (ventilator-associated pneumonia), as well as for the determination of the risk factors by multiresistant (MDR) *P. aeruginosa* infections. We observed a high rate of MDR *P. aeruginosa* isolates (40.7%), being 51.0% independently associated with inappropriate antibiotic therapy. In patients with VAP, significant rates were related to inappropriate therapy, especially by MDR and resistant to fluoroquinolones isolates. Besides, bacteremia was detected in 66.9% of patients, and prolonged hospital stay was expressive in those resistant to fluoroquinolone. Plasmid-mediated quinolone resistance genes (PMQR), were detected in two (5.3%) nosocomial isolates of *P. aeruginosa* (*qnrS*<sub>I</sub> and *aac(6')Ib-cr*), while those of *K. pneumoniae* and *E. coli*, from community or nosocomial origin, the presence of this gene was higher (55.3%; *qnrA*, *qnrB*, *qnrD*, *qnrS* and *aac(6')Ib-cr*). In addition, we could verify the presence of the *aac(6')-Ib*<sub>7</sub> variant, with significant frequency to those of *P. aeruginosa*. Independently of the presence of PMQR genes, the minimum inhibitory concentration (MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub>) for ciprofloxacin were high, as well as, a high frequency of MDR isolates, and among those of the *Enterobacteriaceae* family were mainly community-acquired infection's agents (55.0%) and urinary tract (72.9%). Most isolates (90%) showed class 1 integron, but there is the necessity of further investigation to determine its relationship with PMQR genes. There was detection of genes encoding metallo-β-lactamase in 21.9% of the *P. aeruginosa* isolates, predominantly *bla*<sub>SPM</sub> gene and a polyclonal profile. Moreover, there was not a prevalent clone associated with the presence of PMQR determinants. Our data show for the first time the presence of PMQR determinants in clinical isolates of *P. aeruginosa* in Brazil, with a higher frequency of patients with inappropriate therapy; and multidrug-resistant *K. pneumoniae* and *E. coli* isolates with plasmid-mediated quinolone resistance. Although studies of classical and molecular epidemiology in hospitals are very important in the country, it is necessary that the infection control practices result in reducing these infections based on this data, considering the additional burden of participation of MDR micro-organism and its importance in terms of morbidity, mortality and cost.

**Keywords:** Plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR); metallo-β-lactamase (MBL); Multidrug-resistance; *Pseudomonas aeruginosa*; *K. pneumoniae*; *E. coli*.



## 1. INTRODUÇÃO

Infecções Relacionadas à Assistência a Saúde (IRAS) representam um grave problema de saúde pública, em virtude da considerável elevação dos custos no cuidado do paciente, aumento no tempo de internação, e nas taxas de morbidade e mortalidade (BARSANTI; WOELTJE, 2009; WAWRZYNIAK et al., 2010; ANVISA, 2013a; ANVISA, 2013b). As IRAS representam um dos eventos adversos mais frequentes nos hospitais e os dados sobre a sua epidemiologia são fundamentais para aprimoramento da gestão nos serviços de saúde, visando proporcionar a segurança do paciente (ANVISA, 2013a; ANVISA, 2013b). Em países em desenvolvimento, as IRAS podem ser até 20 vezes mais frequentes quando comparada ao observado em países desenvolvidos, fato associado à falta de recursos humanos, estrutura física e medidas de controle (ZAIDI et al., 2005; ALLEGIANZI et al., 2011; PADOVEZE; FORTALEZA, 2014). Estima-se que 5 a 15% dos pacientes hospitalizados no Brasil adquiram IRAS, com destaque para infecções do trato urinário (35–45%), seguido de trato respiratório (15–25%), corrente sanguínea (10–20%), e sítio cirúrgico (14–16%) (ANVISA, 2013a; ANVISA, 2013b; OLIVEIRA; KOVNER; SILVA, 2010; OLIVEIRA et al., 2012). Um estudo realizado pelo SENTRY na América Latina relatou frequências de infecções de corrente sanguínea, pele/ferida cirúrgica e pneumonia de 52,6%; 22,9%; 13,1%, respectivamente (GALES et al., 2012). Estudos mais abrangentes envolvendo uma vigilância mundial dessas infecções por micro-organismos Gram-negativos mostraram frequências elevadas de bacteremia (63,3%), trato respiratório inferior (21,0%) e ferida/sítio cirúrgico (12,9%) (GALES; JONES; SADER, 2011).

Entre as IRAS, a Infecção de Corrente Sanguínea (ICS) está entre as mais frequentes e graves (MITT et al., 2009) associada com altas frequências de mortalidade e maior tempo de hospitalização, além de se tratar de um marcador de prognóstico ruim (MICEK et al., 2005; SHORR et al., 2006). Na etiologia das bacteremias, os cocos Gram-positivos são usualmente os agentes mais frequentes, embora essa etiologia possa variar inclusive em países em desenvolvimento, como o Brasil, onde há evidências que as condições ambientais possam favorecer a participação de bacilos Gram-negativos (BGN) (TUON; GORTZ; ROCHA, 2012).

Segundo o *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC, 2013) os principais micro-organismos associados às IRAS incluem: *Escherichia coli* (15,9%), *Staphylococcus aureus* (12,3%), *Enterococcus spp.* (9,6%), *Pseudomonas aeruginosa* (8,9%), e *Klebsiella spp.* (8,7%), em que os cocos Gram-positivos predominam em infecções de sítio

cirúrgico e de corrente sanguínea, os da família *Enterobacteriaceae* em infecções do trato urinário, e os Gram-negativos não fermentadores, principalmente *P. aeruginosa* e *A. baumannii*, nas do trato respiratório inferior. Em estudo realizado por Sader e colaboradores (2014) incluindo países da Europa e dos Estados Unidos, evidenciou que as bactérias Gram-negativas predominaram tanto em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) quanto em outras clínicas dos hospitais, com predomínio, respectivamente de *E. coli* (21%; 33,8%), *Klebsiella spp.* (19,3%; 18%) e *P. aeruginosa* (17,6%; 12,0%).

Além dos principais agentes causadores de IRAS, outro aspecto significativo é a resistência bacteriana aos diferentes antibióticos que passou a ser preocupante na maioria dos países, particularmente naqueles em desenvolvimento como o Brasil, nos quais os níveis de resistência dos micro-organismos hospitalares são mais elevados e os aspectos relacionados à epidemiologia e evolução dos pacientes são mais significativos quanto à mortalidade, custos e opções terapêuticas limitadas (SOSA et al., 2010). Em virtude da escassez de dados, falta de recursos humanos e financeiros, bem como de laboratórios de microbiologia e de prática usual na terapêutica antimicrobiana empírica nos hospitais, estudos de infecções graves por micro-organismos multirresistentes devem ser estimulados (TOUFEN JUNIOR et al., 2003; KOLLEF, 2005). As IRAS por bactérias resistentes aos antibióticos aumentaram significativamente a partir da década de 90, com destaque para aquelas infecções por *P. aeruginosa* resistente às fluoroquinolonas (89%) e carbapenêmicos (30%), *Enterococcus* resistentes à vancomicina (55%) e *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (30%) (MURTHY, 2001; OLIVEIRA et al., 2006). Esse problema é claramente evidenciado em hospitais Norte-Americanos, em que a maioria dos micro-organismos isolados (70%) são resistentes ao menos a um antimicrobiano, resultando em internações mais prolongadas com riscos para o agravamento do quadro clínico e óbito (BRUNING, 1996; MURTHY, 2001; OLIVEIRA et al., 2006).

Infecções por bactérias resistentes estão relacionadas a diversos fatores de risco tais como: consumo de antibióticos, gravidade da doença de base, procedimentos invasivos, tempo de hospitalização prolongado, falta e/ou falha nas práticas de prevenção e controle, entre outros (KNOBLER et al., 2003; MELLO et al., 2009; OLIVEIRA; KOVNER; SILVA, 2010; PORTO et al., 2012). Estudos indicam que o uso empírico, inapropriado e intenso de antibióticos deve ser desencorajado, devido a pressão seletiva no ambiente resultante desses medicamentos (SHILAES et al., 1997; FERGUSON, 2004; LIVERMORE, 2005). Há vários relatos na literatura sobre a relação entre o seu uso abusivo e indiscriminado e a ocorrência de micro-organismos multirresistentes (GAYNES, 1997; WHITE et al., 2000; PATRICK et al.,

2004). Estudos realizados em hospitais Brasileiros evidenciam que a prescrição de antibióticos em unidades críticas, com destaque para as cefalosporinas de 3ª e 4ª geração e os carbapenêmicos, é muito maior do que em países da Europa e America do Norte (MEYER et al., 2003; NISS et al., 2004; MOREIRA et al., 2013; PORTO et al., 2013; DANTAS, 2015).

A resistência antimicrobiana adquirida à esses fármacos advém de diversos mecanismos bioquímicos que são codificados por genes e resulta de mutação genética, aquisição de genes exógenos, ou mutação de genes adquiridos (RICE; SAHM; BINOMO, 2003). Há uma diversidade de mecanismos de resistência (DAVIES; DAVIES, 2010), incluindo: diminuição da permeabilidade da membrana externa da parede celular, hiperexpressão de bombas de efluxo, alteração do sítio ativo e inativação enzimática do antibiótico (ALLEN et al., 2010). A participação de elementos genéticos móveis, tais como transposons e plasmídeos potencializam a transferência destes genes (ALEKSHUN; LEVY, 2007), facilitando sua disseminação no ambiente (HUDDLESTON, 2014). Adicionalmente, a existência de elementos genéticos denominados integrons, presentes no cromossomo ou plasmídeo (BENNETT, 2008; CHOWDHURY; STOKES; LABBATE, 2011; ODUMOSU; ADENIYI; CHANDRA, 2013) também potencializa a aquisição de genes de resistência exógenos (SUMMERS, 2006; CHANG et al., 2011).

Os integrons são sistemas gênicos que capturam ORFs (“*Open reading frame*”), destacando-se genes de resistência aos antibióticos, que são incorporados na forma de cassetes através de um gene (*intI*) que transcreve uma integrase também presente na sua estrutura (ROWE-MAGNUS; MAZEL, 2001; MAZEL, 2006; DEPARDIEU et al., 2007). Eles residem frequentemente, em transposons, localizados no cromossomo ou plasmídeo, podendo resultar na multirresistência de micro-organismos, sobretudo na família *Enterobacteriaceae* e de bacilos Gram-negativos não fermentadores, nos quais sua presença carreando genes de resistência é comum (FLUIT; SCHMITZ, 2004; DEPARDIEU et al., 2007; WHITE; MCIVER; RAWLINSON, 2001; MAGUIRE et al., 2001).

De modo geral, os micro-organismos da família *Enterobacteriaceae* constituem cerca de 80% das amostras clínicas de bacilos Gram-negativos de importância médica e cerca de 50% das bactérias recuperadas nos laboratórios de microbiologia (EISENSTEIN; ZALEZNIK, 2000). O estudo de vigilância MYSTIC evidenciou que, em UTIs no Brasil, *Klebsiella pneumoniae* é o terceiro Gram-negativo mais frequente (12,1%), seguido de *Escherichia coli* (10,5%), *Enterobacter cloacae* (7,9%), *Serratia marcescens* (5,6%) e *Proteus mirabilis* (3,2%) (MENDES et al., 2005).

O gênero *Klebsiella*, com predomínio da espécie *K. pneumoniae*, destaca-se como agente de infecções do trato urinário, pneumonias, infecções de feridas cirúrgicas e bacteremias (PODSCHUN; ULLMANN, 1998). Dados do estudo multicêntrico SENTRY para América Latina, refere que *K. pneumoniae* ocupa o segundo lugar como causa de infecções urinárias em pacientes hospitalizados (10,3%), enquanto que *E. coli* destaca-se como o principal agente dessas infecções (57,2%) (SADER et al., 2004). Além disso, a resistência desses dois micro-organismos aos antimicrobianos é maior nos países da América Latina do que em outras regiões do mundo (JONES, 2003; SADER et al., 2004), aspecto que pode ser devido a fatores socioeconômicos (ROSSI, 2011). *Escherichia coli* é um dos principais agentes de infecções urinárias comunitárias, mas também tem participação importante naquelas de origem hospitalar (KARLOWSKY et al., 2001; MANDAL et al., 2012; DAOUD et al., 2015). Segundo o estudo de Daoud e Afif (2011) em um hospital universitário localizado em Beirute, Líbano, *E. coli* foi o BGN mais frequente em um período de 10 anos (60,64%), e dados mais recentes sugerem que as amostras de *E. coli* produtoras de ESBL recuperadas de infecções urinárias apresentam grande importância epidemiológica devido a presença de plasmídeos carreando genes que expressam estas enzimas (DAOUD et al., 2015).

Atualmente, observa-se também um aumento na importância de BGN não fermentadores, destacando-se *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*, associados à etiologia de infecções relacionadas à assistência à saúde quanto à multirresistência aos antibióticos (PELEG; HOOPER, 2010; MEMISH et al., 2012). Essas bactérias apresentam resistência intrínseca à maioria das classes de antibióticos, além do grande potencial para adquirir resistência de origem exógena (ZAVASCKI et al., 2010). A disseminação de *P. aeruginosa* multirresistentes (MDR) é comum em hospitais, particularmente naqueles de países em desenvolvimento, devido à seleção desses patógenos pela força pressora resultante do uso abusivo de antibióticos (SADER et al., 2005; BREIDENSTEIN; DE LA FUENTE-NÚÑEZ; HANCOCK, 2011). Nas infecções causadas por *P. aeruginosa* multirresistentes, os carbapenêmicos aparecem como escolha terapêutica no tratamento de infecções graves, entretanto seu uso está ameaçado pelo aumento na incidência de amostras resistentes a esses antibióticos (GALES et al., 2003; QUALE et al., 2006; GALES et al., 2012). Em hospitais brasileiros, a resistência aos carbapenêmicos em amostras de *P. aeruginosa* é superior a 60% (KIFFER et al., 2005; BAUMGART; MOLINARI; SILVEIRA, 2010) e deve-se principalmente à produção de metalo- $\beta$ -lactamases (MBLs) e outras  $\beta$ -lactamases com atividade carbapenemase (KPC e OXA-carbapenemase) (GALES et al., 2003; QUALE et al., 2006; CEZARIO et al., 2009; SCHEFFER et al., 2010a).

A produção de MBLs com capacidade de hidrolisar todos os  $\beta$ -lactâmicos, com exceção dos monobactâmicos (aztreonam) por esse micro-organismo é de grande importância epidemiológica e está relacionada com altas taxas de mortalidade (SAMUELSEN et al., 2010). Atualmente, reconhece-se diversas subclasses dessas enzimas, incluindo: IMP (*Imipenemase*), VIM (*Verona Imipenemase*), SPM-1 (*São Paulo MBL*); GIM (*German Imipenemase*), SIM-1 (*Seul Imipenemase*) (MENDES et al., 2006), 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), DIM-1 (*Dutch imipenemase*) (POIREL et al., 2009) e FIM-1 (*Florence imipenemase*) (POLLINI et al., 2013; ZHAO; HU, 2015). As subclasses IMP-1 e SPM-1 são as duas prevalentes no Brasil (MENDES et al., 2006), e o aumento de infecções e colonizações por *P. aeruginosa* produtora de SPM, sugere que o gene *bla*<sub>SPM-1</sub> se estabeleceu em plasmídeos e está associado a clones de alto risco, com maior potencialidade de disseminação (WOODFORD, 2010; ANDRADE; WOODFORD; DARINI, 2014).

Como mencionado anteriormente, o uso indiscriminado de antimicrobianos no ambiente hospitalar constitui um fator de risco para a emergência de micro-organismos multirresistentes (SILVA et al., 2006). No Brasil essa questão é ainda mais significativa devido a alta densidade de uso de antibióticos, particularmente das classes de  $\beta$ -lactâmicos, incluindo carbapenêmicos, e de fluoroquinolonas (MOREIRA et al., 2013; PORTO et al., 2013; DANTAS, 2015).

Atualmente, a resistência às fluoroquinolonas em amostras hospitalares de *K. pneumoniae*, *E. coli* e *P. aeruginosa* tornou-se um problema mundial, com frequências maiores nos países Latino-Americanos (LISTER; WOLTER; HANSON, 2009; MINARINI; DARINI, 2012). Os principais mecanismos de resistência às fluoroquinolonas incluem: (i) mutações nas regiões determinantes de resistência às quinolonas (QRDRs), de genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* e/ou *parE*; (ii) resistência às quinolonas mediada por plasmídeo (PMQR); (iii) diminuição da absorção do fármaco pela perda de porina da membrana externa e/ou sua eliminação através de bombas de efluxo (RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 2011).

A resistência às quinolonas mediada por plasmídeo (PMQR) pode justificar a disseminação rápida de resistência entre os BGN, particularmente naqueles da família *Enterobacteriaceae* (KIM et al., 2009), com a possibilidade da existência de diversos mecanismos entre as espécies (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011). Embora os genes PMQR sejam cada vez mais relatados nesses micro-organismos eles não são usualmente detectados em amostras de *P. aeruginosa* (RODRÍGUEZ -MARTÍNEZ et al., 2011; JIANG et

al., 2014). Até o momento, são conhecidos três mecanismos de PMQR: proteção do sítio alvo, alteração do antimicrobiano e sistemas de efluxo (RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 2011; RUIZ; PONS; GOMES, 2012; POIREL; CATTOIR; NORDMANN, 2012).

Determinantes Qnr (“*quinolone resistance*”), pertencentes à família pentapeptídica de repetição (PRP), tem como função a proteção das enzimas DNA girase e topoisomerase IV da inibição por fluoroquinolonas, uma vez que a proteína Qnr se fixa à essas enzimas e compete pelo DNA da bactéria (TRAN; JACOBY, 2002; ELLINGTON; WOODFORD, 2006; ROBICSEK et al., 2006b; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011). Esse determinante é representado por diversos alelos: *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *qnrVC* (STRAHILEVITZ et al., 2009).

Outro mecanismo de PMQR é aquele codificado por uma variante de aminoglicosídeo acetil-transferase (*aac(6')-Ib-cr*), no qual há inativação dos aminoglicosídeos: amicacina, canamicina e tobramicina, além de acarretar redução na susceptibilidade à ciprofloxacina e norfloxacina, devido a N-acetilação no radical amino no seu grupo/radical piperazinil (ROBICSEK et al., 2006b; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011). As substituições nos aminoácidos Trp102Arg e Asp179Tyr presentes em *aac(6')-Ib-cr* (variantes resistentes à ciprofloxacina), são essenciais e suficientes para provocar a acetilação dessas fluoroquinolonas (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011).

Além disso, sistemas de bomba de efluxo codificados por genes *qepA* e *oqxAB*, localizados em plasmídeos, aumentam o nível de resistência às fluoroquinolonas e outros antibióticos não relacionados, devido à sua eliminação para o exterior da célula (YAMANE et al., 2007; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011).

Os diversos mecanismos de resistência existentes em BGN, exclusivos ou combinados, somados a escassez de antibióticos disponíveis no momento para tratamento dessas infecções, e a importância epidemiológica de algumas linhagens, tornaram esses micro-organismos um grande desafio no ambiente hospitalar (TENOVER, 1995; KAPIL, 2005; CDC, 2010).

Entre os métodos de tipagem molecular disponíveis, o *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) é uma das principais ferramentas para definir se os micro-organismos são epidemiologicamente e geneticamente relacionados, auxiliando na investigação de surtos, na caracterização de transmissão cruzada e fontes de infecção, como também no monitoramento e controle das infecções relacionadas à assistência à saúde (SABAT et al., 2013). O método de PFGE é amplamente utilizado na classificação das amostras em linhagens clonais em virtude de seu alto poder discriminatório, tipabilidade e reprodutibilidade (SABAT et al., 2013).

Devido à rápida disseminação mundial de resistência entre micro-organismos hospitalares, a detecção e o conhecimento de características epidemiológicas e moleculares de patógenos Gram-negativos epidemiologicamente importantes como *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e *E. coli*, é de fundamental importância para melhor conhecimento da epidemiologia das IRAS, bem como no desenvolvimento de estratégias para o seu tratamento, prevenção e controle (PELEG; HOOPER, 2010; MATTNER et al., 2012).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Realizar estudo epidemiológico-molecular de infecções hospitalares e comunitárias por amostras de *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* resistentes às fluoroquinolonas, e *Pseudomonas aeruginosa* resistentes às fluoroquinolonas e/ou carbapenêmicos, em pacientes atendidos no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.

### 2.2. Objetivos específicos

- Analisar fatores de risco associados às infecções por *P. aeruginosa* MDR;
- Avaliar o impacto da terapia antimicrobiana inapropriada na evolução clínica dos pacientes com infecções graves por *P. aeruginosa*;
- Avaliar a epidemiologia de infecções por *K. pneumoniae* e *E. coli* resistentes às fluoroquinolonas quanto a sua natureza, hospitalar ou comunitária, bem como o perfil de resistência e o impacto da terapia antimicrobiana nessas infecções.
- Relacionar as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) para ciprofloxacina em amostras de *K. pneumoniae*, *E. coli* e *P. aeruginosa*; e para imipenem naquelas de *P. aeruginosa* com a presença de genes PMQR;
- Determinar os genes responsáveis por expressão de metalo- $\beta$ -lactamases (*bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>SPM</sub>, *bla*<sub>GIM</sub> e *bla*<sub>SIM</sub>) em amostras de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos;
- Determinar a frequência dos genes PMQR (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr* e *qepA*) e integrons de classe I (*intI*) em amostras de *K. pneumoniae*, *E. coli* e *P. aeruginosa*;
- Verificar a presença da variante *cr* no gene *aac(6')-Ib* através de sequenciamento gênico;
- Determinar o perfil clonal de *K. pneumoniae*, *E. coli* e *P. aeruginosa* por PFGE.



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Hospital

O Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU) é um complexo hospitalar público, universitário, de assistência terciária, com capacidade para 530 leitos. É referência para uma população estimada de mais de dois milhões de habitantes, moradores de Uberlândia e de 81 municípios da região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba.

#### 3.2. Desenho do estudo

O estudo epidemiológico-molecular foi conduzido em duas etapas utilizando os sistemas de vigilância descritos abaixo (**Figura suplementar 1, Apêndice A**).

#### **Vigilância I: Infecções por *P. aeruginosa* resistentes às fluoroquinolonas e/ou carbapenêmicos**

Foi realizado estudo observacional através de vigilância ativa no período de abril a outubro de 2014, e, adicionalmente uma investigação retrospectiva em UTI de adultos (pacientes com PAV) e Laboratório de Microbiologia do HC-UFU (pacientes com bacteremia), no período de março de 2011 a novembro de 2012, e maio de 2009 a dezembro de 2012, respectivamente.

A partir dos dados obtidos através dessa vigilância três estudos caso-controle foram conduzidos: (i) para determinar os fatores de risco associados com o desenvolvimento de infecção por *P. aeruginosa* multirresistente considerou-se caso (pacientes com infecção por *P. aeruginosa* multirresistente) *versus* controle (pacientes com infecção por *P. aeruginosa* não multirresistente), (ii) para determinar os fatores de risco associados com o desenvolvimento de bacteremia por *P. aeruginosa*, casos (pacientes com bacteremia por *P. aeruginosa*) *versus* controle (pacientes com outras infecções por *P. aeruginosa* sem o desenvolvimento de bacteremia), e (iii) para determinar os fatores de risco associados com o desenvolvimento de PAV por *P. aeruginosa*, caso (pacientes com PAV por *P. aeruginosa*) *versus* controle (pacientes com outras infecções por *P. aeruginosa* sem o desenvolvimento de PAV). Neste último estudo não foram incluídos na análise oito pacientes com suspeita de pneumonia, que não foram confirmados como de PAV. Em todos esses estudos foram considerados apenas o primeiro episódio de cada infecção. As características demográficas, clínicas e

epidemiológicas dos pacientes foram obtidas através da revisão de prontuários médicos utilizando-se uma ficha individual, seguindo o modelo do NHSN (**Anexo A**).

### **Vigilância II: Infecções por *K. pneumoniae* e *E. coli* resistentes às fluoroquinolonas**

Foi realizado um estudo observacional retrospectivo através de vigilância ativa no Laboratório de Microbiologia do HC-UFU, para a detecção de pacientes com infecção por amostras de *K. pneumoniae* e *E. coli* resistentes às fluoroquinolonas de origens comunitária e hospitalar, no período de abril a outubro de 2014. Neste estudo também considerou-se apenas o primeiro episódio de cada infecção. Foi investigada a terapia antimicrobiana apropriada/inapropriada e o seu impacto na evolução dos pacientes com infecções por amostras de *K. pneumoniae* e *E. coli* resistentes às fluoroquinolonas. As características demográficas, clínicas e epidemiológicas dos pacientes foram obtidas através da revisão de prontuários médicos utilizando-se uma ficha individual, seguindo o modelo do NHSN (*National Healthcare Safety Network*) (**Anexo A**).

### **3.3. Definições**

**Infecção Relacionada à Assistência à Saúde (IRAS):** infecção adquirida após a admissão do paciente no hospital, durante a internação ou após a alta, desde que estejam relacionadas com a internação ou com os procedimentos realizados durante a mesma (RODRIGUES; RICHTMANN, 2008).

**Bacteremia:** presença de bactérias na corrente sanguínea comprovadas laboratorialmente. A bacteremia é classificada como primária quando não é relatado outro foco da infecção, e secundária quando clinicamente relacionada a outro sítio anatômico de infecção, como pulmão, trato urinário, infecção de sítio cirúrgico e outros (CDC, 2002; BAUMGART; MOLINARI; SILVEIRA, 2010).

**Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica (PAV):** pacientes sob ventilação mecânica por período  $\geq 48$  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°C ou menor que 35°C, contagem de leucócitos maior que 10000/ $\mu$ l com desvio a esquerda ou menor que 3000/ $\mu$ l e cultura

quantitativa de aspirado traquel com contagem  $\geq 106$  UFC/mL (ALP; VOSS, 2006; XIE et al., 2011).

**Micro-organismo multirresistente (MDR):** resistência a pelo menos um agente em 3 ou mais categorias de antimicrobianos (MAGIORAKOS et al., 2012).

**Terapia antimicrobiana inapropriada:** quando o micro-organismo 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).

**Terapia antimicrobiana apropriada:** quando os antibióticos iniciais administrados dentro de 24 horas e que incluía pelo menos um antibiótico ativo *in vitro* (GILBERT et al., 2007).

**Uso prévio de antimicrobianos:** quando o paciente recebeu terapia com qualquer antibiótico durante pelo menos 72h em um período de até 30 dias prévio ao diagnóstico microbiológico da infecção (GULEN et al., 2015).

**Hospitalização prolongada:** o tempo de hospitalização foi considerado prolongado quando se atingiu ou ultrapassou 45 dias (MCCLARAN; BERGLAS; FRANCO, 1996).

**Mortalidade hospitalar (30 dias):** número de óbitos dos pacientes com infecções durante a hospitalização, que ocorreu em até 30 dias após o diagnóstico de infecção (LODISE et al., 2007).

**Mortalidade precoce (5 dias):** número de óbitos dos pacientes com infecções em até 5 dias após o diagnóstico de infecção (BURGOS et al., 2015).

**Origem hospitalar e comunitária:** amostras foram classificados como de origem hospitalar ou comunitária se a infecção ocorreu  $\geq 48$  horas ou  $< 48$  horas após a admissão no hospital, respectivamente (BOUCHILLON et al., 2012).

**CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub>:** a concentração do agente antimicrobiano ( $\mu\text{g/mL}$ ) capaz de inibir 50% e 90%, respectivamente, das amostras testadas (SCHWARZ et al., 2010).

### 3.4. Amostras bacterianas

Foram selecionadas para o estudo amostras clínicas de *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* resistentes às fluoroquinolonas, e de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes às fluoroquinolonas e/ou carbapenêmicos. A coleta do espécime clínico foi realizada por profissionais do HC-UFU de acordo com a rotina do hospital. Eles foram cultivados e estocados a -80°C para avaliações microbiológicas e moleculares posteriores no Laboratório de Microbiologia Molecular (MICROMOL-UFU). As amostras controles utilizados nos experimentos estão relacionados na **tabela 1**.

**Tabela 1** - Linhagens controle utilizadas em cada experimento

<b>Linhagem</b>	<b>Experimento</b>
<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	Positivo para <i>P. aeruginosa</i>
<i>E. coli</i> IAL45	Positivo para <i>E. coli</i>
<i>K. pneumoniae</i> 10031	Positivo para <i>K. pneumoniae</i> ; Negativo para resistência aos carbapenêmicos e fluoroquinolonas
<i>P. aeruginosa</i> 48-1997	Positiva para o gene <i>bla<sub>SPM</sub></i>
<i>P. aeruginosa</i> 101-4704	Positiva para o gene <i>bla<sub>IMP</sub></i>
<i>P. aeruginosa</i> A1254	Positiva para o gene <i>bla<sub>VIM</sub></i>
<i>A. baumannii</i> YMC03/9/T104	Positiva para o gene <i>bla<sub>SIM</sub></i>
<i>P. aeruginosa</i> 75-5671	Positiva para o gene <i>bla<sub>GIM</sub></i>
<i>Salmonella</i> spp	Positiva para o gene <i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> , <i>qnrC</i> , <i>qnrD</i> e <i>qnrS</i>
<i>E. coli</i>	Positiva para o gene <i>qepA</i>
<i>E. coli</i> 07 (JF923531)	Positiva para o gene <i>aac(6')-Ib-cr</i>
<i>Salmonella</i> spp	Positiva para o gene <i>intI</i>
KPC 05	Resistência aos carbapenêmicos
<i>Salmonella</i> spp	Resistência às fluoroquinolonas

### 3.5. Identificação das espécies e teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

A identificação das espécies foi realizada utilizando-se o sistema automatizado VITEK®2 (BioMérieux) no Laboratório de Microbiologia do HC-UFU. As amostras foram suspensas em solução salina 0,45% com turbidez compatível à escala de 0,50 a 0,63 de McFarland, medida em turbidímetro. Em seguida, os cartões foram inseridos no aparelho e cada teste bioquímico foi preenchido, selado e incubado automaticamente. Durante o período

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

Para avaliação do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos, os inóculos foram preparados como na identificação e as suspensões diluídas conforme recomendação 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, a concentração inibitória mínima (CIM) de cada antibiótico é estimado. Esse cálculo é realizado com um algoritmo específico para cada antimicrobiano independente da espécie do micro-organismo.

A confirmação da resistência e a exata concentração inibitória mínima ao imipenem foram realizadas pelo método E-Test® no Laboratório de Microbiologia Molecular de acordo com as orientações do fabricante (AB Biodisk, Solna, Suécia) para as amostras de *P. aeruginosa*, considerando-se resistentes quando  $\geq 8 \mu\text{g/mL}$  (CLSI, 2014). As amostras de *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e *E. coli* foram testadas para ciprofloxacina realizada pelo método de microdiluição em caldo de acordo com Capuano (2012) com modificações, e as interpretações segundo o CLSI (2014), considerando-se resistente quando  $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ . Posteriormente determinou-se a CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> (SCHWARZ et al., 2010). A CIM foi realizada para 38 amostras de *P. aeruginosa*, 20 de *K. pneumoniae* e 20 *E. coli*.

### **3.6. Armazenamento das bactérias**

As amostras foram 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 *overnight* a 37°C. A suspensão resultante foi estocada a temperatura de -80°C (KONEMAN et al., 2001).

### **3.7. Técnicas moleculares**

#### **3.7.1. Extração do DNA plasmidial**

Para a extração do DNA plasmidial das amostras de *K. pneumoniae*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, foi utilizado o kit de extração PureYield™ Plasmid Miniprep System (PROMEGA, Brazil), seguindo-se as recomendações do fabricantes.

### 3.7.2. Caracterização dos genes Integron de Classe I

Foi realizada utilizando a técnica de PCR *end point*. Os *primers* utilizados nas reações estão descritos na **tabela 2**.

**Tabela 2** - *Primers* para detecção dos genes codificadores de integron de classe 1 em amostras de *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*

Gene	Primers	Sequência (5'- 3')	Produto amplificado (pb)	Referência
<i>intI</i>	intI1-F	GCATCCTCGGTTTTCTGG	698	WU et al., 2012
	intI1-R	GGTGTGGCGGGCTTCGTG		

Para a amplificação dos genes de resistência a reação foi preparada para um volume final de 25 µL utilizando os seguintes reagentes: água ultra pura autoclavada (q.s.p.), 12,5 µL de GoTaq® Green Master Mix (Promega), 0,5 µL de cada *primer* específico (**Tabela 2**) e 1 µL (10ng/µL) da suspensão de DNA extraído conforme descrito anteriormente.

A amplificação foi realizada no *Eppendorf Mastercycler*, programado de acordo com as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos; seguido de 30 ciclos com desnaturação a 95°C por 30 segundos; anelamento a 56°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto, e extensão final a 72°C por 5 minutos.

A análise dos produtos da reação foi realizada utilizando-se 10 µL dos produtos amplificados, transferidos para um gel de agarose a 1,5% em tampão TBE [0,5x] e 5 µL de SYBR® Safe (Invitrogen) para cada 100 mL de gel. O marcador de peso molecular utilizado foi 100 pb DNA Ladder (BioAmerica Inc). A eletroforese correu a 90V por 90 minutos, e o gel foi fotografado utilizando o sistema de fotodocumentação L-Pix EX (Loccus Biotecnologia).

### 3.7.3. Caracterização dos genes de resistência aos carbapenêmicos

Para investigar a presença dos genes codificadores de metalo-β-lactamases relacionados à resistência aos carbapenêmicos em amostras de *P. aeruginosa*, ampliações

foram realizadas pela técnica de PCR *multiplex* com os *primers* específicos para *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>SPM</sub>, *bla*<sub>GIM</sub> e *bla*<sub>SIM</sub> como descritos na **tabela 3**.

**Tabela 3** - *Primers* para detecção dos genes codificadores de metalo- $\beta$ -lactamases em *Pseudomonas aeruginosa*

Gene	Sequência (5' - 3')	Produto amplificado (pb)	Referência
<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	GAATAGRRTGGCTTAAYTCTC CCAAACYACTASGTTATC	188	WOODFORD, 2010
<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	GTTTGGTCGCATATCGCAAC AATGCGCAGCACCAGGATAG	382	WOODFORD, 2010
<i>bla</i> <sub>SPM</sub>	CTAAATCGAGAGCCCTGCTTG CCTTTTCCGCGACCTTGATC	798	WOODFORD, 2010
<i>bla</i> <sub>GIM</sub>	TCAATTAGCTCTTGGGCTGAC CGGAACGACCATTGGAATGG	72	WOODFORD, 2010
<i>bla</i> <sub>SIM</sub>	GTACAAGGGATTTCGGCATCG TGGCCTGTTCCCATGTGAG	569	WOODFORD, 2010

Para a amplificação dos genes codificadores de MBLs a reação foi preparada conforme descrita no item 3.7.2 utilizando-se *primers* específicos da **tabela 3**.

A amplificação foi realizada no *Eppendorf Mastercycler*, programado de acordo com as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos; seguido de 30 ciclos com desnaturação a 95°C por 30 segundos; anelamento a 54°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto, e extensão final a 72°C por 5 minutos.

A análise dos produtos da reação, eletroforese e documentação do gel também foram realizadas como descrito no item 3.7.2.

#### 3.7.4. Caracterização dos genes PMQR

Foram realizadas amplificações dos genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *qepA* e *aac(6')-Ib-cr* pela técnica de PCR *end point* e *multiplex* com os *primers* específicos descritos na **tabela 4**.

**Tabela 4** - *Primers* para detecção dos genes PMQR em amostras de *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*

Gene	Sequência (5' - 3')	Produto amplificado (pb)	Referência
<i>aac(6')-Ib</i>	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA CTCGAATGCCTGGCGTGTTT	482	PARK et al., 2006
<i>aac(6')-Ib-cr</i> <sup>1</sup>	CGTCACTCCATACATTGCAA		
<i>qnrA</i>	ATTTCTCACGCCAGGATTTG GATCGGCAAAGGTTAGGTCA	516	KIM et al., 2009
<i>qnrB</i>	GATCGTGAAAGCCAGAAAGG ATGAGCAACGATGCCTGGTA	476	KIM et al., 2009
<i>qnrC</i>	GGGTTGTACATTTATTGAATCG CACCTACCCATTTATTTTCA	307	KIM et al., 2009
<i>qnrD</i>	CGAGATCAATTTACGGGGAATA AACAAGCTGAAGCGCCTG	644	HU et al., 2012
<i>qnrS</i>	GCAAGTTCATTGAACAGGGT TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG	428	KIM et al., 2009
<i>qepA</i>	AACTGCTTGAGCCCGTAGAT GTCTACGCCATGGACCTCAC	596	KIM et al., 2009

<sup>1</sup>Primer utilizado no sequenciamento.

Para a amplificação dos genes de resistência a reação foi preparada conforme descrita no item 3.7.2 utilizando-se *primers* específicos da **tabela 4**.

Foi realizada PCR *multiplex* para detecção de diferentes genes PMQR (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, e *qnrS*) e para os demais PCR *end point* (*qnrD*, *qepA* e *aac(6')-Ib*). A amplificação foi realizada no *Eppendorf Mastercycler*, programado de acordo com as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos; seguido de 30 ciclos com desnaturação a 95°C por 30 segundos; 1 minuto de temperatura de anelamento (sendo, 51°C para o *multiplex* e para o gene *qnrD*; e 52°C para *qepA* e *aac(6')-Ib-cr*), extensão a 72°C por 1 minuto, e extensão final a 72°C por 5 minutos.

A análise dos produtos da reação, eletroforese e documentação do gel também foram realizadas como descrito no item 3.7.2.



### 3.7.5. Sequenciamento dos fragmentos de DNA amplificados (*qnrS* e *aac(6')-Ib*)

O sequenciamento do fragmento amplificado referente ao gene *qnrS* de uma amostras de *P. aeruginosa* foi realizado. Além disso, para confirmar a presença da variante -cr no gene *aac(6')-Ib* foi também efetuado o sequenciamento dos fragmentos amplificados em amostras de *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e *E. coli*. Os demais genes não foram sequenciados.

Os produtos amplificados foram purificados utilizando o Kit comercial Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA), conforme as instruções do fabricante. 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* 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"*.

A partir dos *softwares* SeqMan e MegAlign (DNASTAR Inc. Madison, USA) as sequências obtidas foram analisadas. Além disso, as sequências dos genes *qnrS<sub>1</sub>*, *aac(6')-Ib-cr* e *aac(6')-Ib<sub>7</sub>* foram comparadas com os números de acesso JQ619636.1, AAL93141 e Y11946, respectivamente e posteriormente, depositas no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), com o seguinte número de acesso **KT962252**, **KT987419** e **KT987420**, respectivamente.

### 3.7.6. Tipagem molecular pela técnica de Eletroforese em Campo Pulsado

Uma colônia bacteriana foi inoculada em 3 mL de caldo TSB e incubada *overnight* a 37° C, sob agitação a 200 rpm. Após o período de incubação, a medida da densidade óptica da suspensão bacteriana resultante foi ajustada para 0,9 a 1,10 (OD<sub>640 nm</sub>). Uma alíquota de 200 µL 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 ressuspenso em 200 µL de tampão TE, 10 µL de Proteinase K e 200 µL de agarose *low melting point* 2,2% (Ludwig Biotec) preparada em tampão TE foi adicionada 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 125 µL 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 µL da solução tampão da enzima *SpeI* 1X (Vivants) para *P. aeruginosa* e tampão da enzima *XbaI* para *K. pneumoniae* e *E. coli* e mantida a 37° C *overnight*. Essa solução foi desprezada, e uma nova solução de tampão acrescida de 30 U da enzima de restrição *SpeI* para *P. aeruginosa*, e 40 U da enzima de restrição *XbaI* para *K. pneumoniae* e *E. coli* 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 e o peso molecular (Lambda Ladder PFG Marker, New England Biolabs) foram dispostos 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 por 30 minutos. O perfil eletroforético de macrorrestrição foi analisado utilizando o software BioNumerics versão 5.01 (Applied Maths, Bélgica). A similaridade genética das amostras 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). Amostras com similaridade genética superior a 80% foram considerado do mesmo tipo clonal.

### 3.8. Análise estatística

Os fatores de risco foram avaliados individualmente contra uma variável resposta (análise univariada) através de tabelas de contingência do tipo dois por dois (2 x 2) utilizando-se o teste do  $\chi^2$  para comparação entre os valores quando o n foi maior que 5 e o teste exato de Fisher quando o n foi menor ou igual a cinco. Para comparar variáveis quantitativas foram utilizados os testes *t* de *Student* ou U de Mann Whitney, quando apropriado. Os fatores de risco significativos na análise univariada foram avaliados através de análise multivariada por meio de regressão logística múltipla. A significância estatística foi definida por um valor de  $P \leq 0,05$  utilizando os programas estatísticos Graph Pad Prism 5.0® e Bioestat 5.0®.

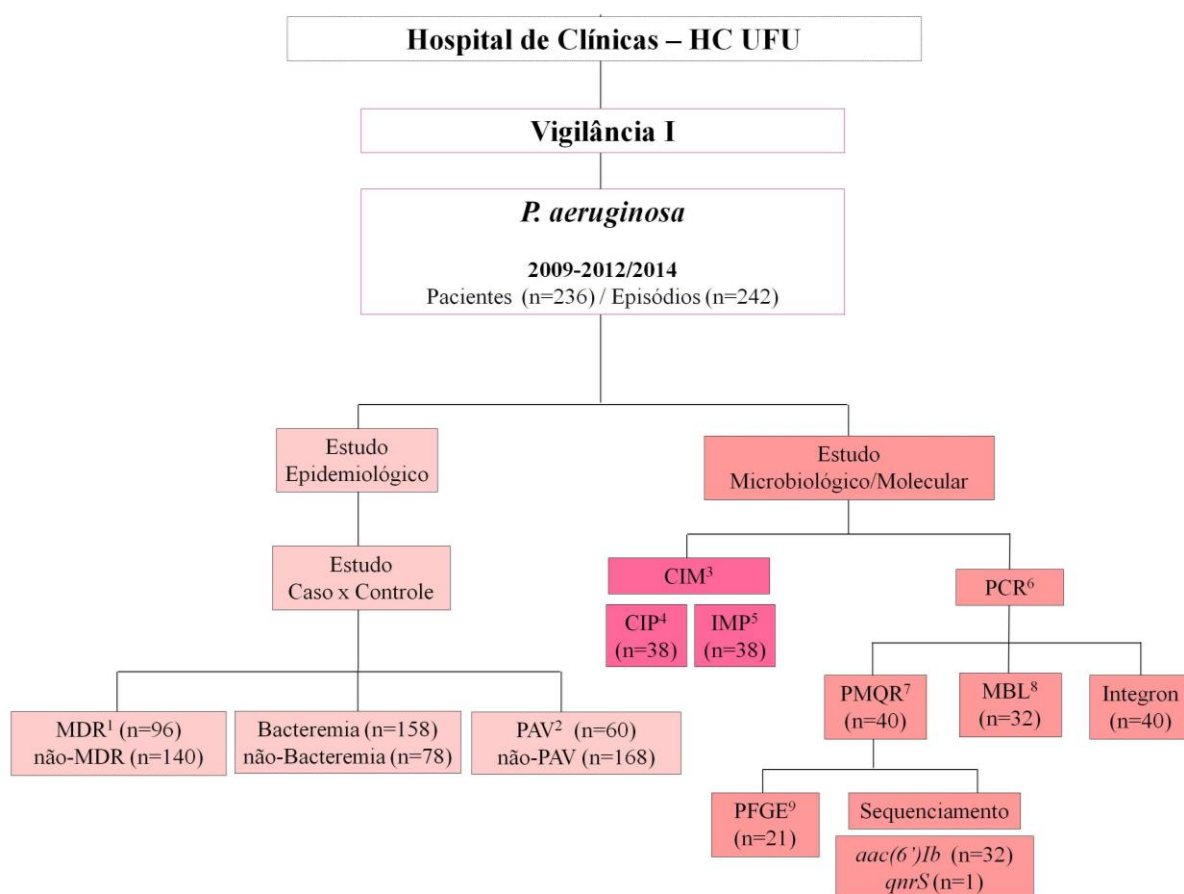
### 3.9. Comitê de Ética

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia sob o número de protocolo: 36601814.7.0000.5152 (**Anexo B**).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Vigilância I: Infecções por *P. aeruginosa* resistentes às fluoroquinolonas e/ou carbapenêmicos

No total, 242 episódios foram observados no período de maio de 2009 a dezembro de 2012, e abril a outubro de 2014, em 236 infecções por *P. aeruginosa*. O estudo epidemiológico-molecular e os experimentos realizados estão resumidos na **figura 1**.



**Figura 1** - Organograma da população estudada: infecções por *Pseudomonas aeruginosa*. <sup>1</sup>Multirresistente; <sup>2</sup>Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica; <sup>3</sup>Concentração inibitória mínima; <sup>4</sup>Ciprofloxacina; <sup>5</sup>Imipenem; <sup>6</sup>Reação em Cadeia da Polimerase; <sup>7</sup>Plasmid-mediated quinolone resistance; <sup>8</sup>Metalo- $\beta$ -lactamase; <sup>9</sup>Pulsed field gel electrophoresis. Não foi possível avaliar se havia a presença do gene *aac(6')-Ib* em duas amostras.

Características dos pacientes, mortalidade e os fatores de risco independentemente associados com infecções por *P. aeruginosa* multirresistentes estão representados na **tabela 5**. De acordo com os resultados do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos, infecções por *P. aeruginosa* com fenótipo MDR responderam por 40,7% dos casos. Os dados destes

pacientes (MDR) foram comparados com o grupo daqueles com infecções por *P. aeruginosa* suscetíveis (não-MDR), sendo observada uma associação do grupo caso (MDR) com o uso prévio de carbapenêmicos, terapia antimicrobiana inapropriada, bem como *diabetes mellitus* pela análise univariada, mas apenas a terapia inapropriada foi fator de risco independentemente associado à multirresistência.

O resultado da curva de sobrevivência de *Kaplan–Meier* demonstrou que o grupo de pacientes que receberam terapia inapropriada teve menor probabilidade de sobrevivência e em menor tempo, do que aqueles que receberam terapia apropriada ( $P=0,0047$ ), com frequências de mortalidade em 30 dias de 55,3% e 34,4%, respectivamente. Além disso, a frequência da mortalidade em 5 dias foi de 40,6% (54/133) quando comparada a mortalidade total (**Figura 2**).

**Tabela 5** – Características dos pacientes, mortalidade e fatores de risco independentemente associados com infecções por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes

(continua)

Fatores de risco/ Características	Total n=236 (%)	MDR <sup>1</sup> n=96 (%)	não-MDR n= 140 (%)	Univariada		Multivariada	
				OR <sup>2</sup> (CI <sup>3</sup> 95%)	P	OR (CI 95%)	P
Idade [média]; ± SD <sup>4</sup>	52,7; ±22,9	56,5; ±18,3	50,6; ±25,1	-	0,2111	-	-
Masculino	166 (70,3)	65 (67,7)	101 (72,1)	0,81 (0,46 – 1,42)	0,4638	-	-
Feminino	70 (29,7)	31 (32,3)	39 (27,8)	1,23 (0,70 – 2,17)	0,4638	-	-
Tempo de hospitalização [média]; ±SD	55,0; ±69,7	54,7; ±46,5	53,3; ±80,9	-	0,0669	-	-
Procedimentos invasivos	210 (88,9)	86 (89,6)	123 (87,9)	1,19 (0,52 – 2,72)	0,6824	-	-
Ventilação mecânica	126 (53,4)	58 (60,4)	68 (48,6)	1,62 (0,95 – 2,74)	0,0731	-	-
Traqueostomia	120 (50,8)	56 (58,3)	64 (45,7)	1,66 (0,98 – 2,81)	0,0568	-	-
Cateter urinário	163 (69,1)	71 (73,9)	92 (65,7)	1,48 (0,83 – 2,63)	0,1783	-	-
Cateter venoso central	192 (81,4)	77 (80,2)	115 (82,1)	0,88 (0,45 – 1,71)	0,7078	-	-
Dreno	41 (17,4)	17 (17,7)	24 (17,1)	1,04 (0,52 – 2,06)	0,9103	-	-
Nutrição gástrica/Sonda enteral	172 (72,9)	71 (73,9)	101 (72,1)	1,10 (0,61 – 1,97)	0,7580	-	-

**Tabela 5** - Características dos pacientes, mortalidade e fatores de risco independentemente associados com infecções por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes

(continuação)

Fatores de risco/ Características	Total n=236 (%)	MDR <sup>1</sup> n=96 (%)	não-MDR n= 140 (%)	Univariada		Multivariada	
				OR <sup>2</sup> (CI <sup>3</sup> 95%)	P	OR (CI 95%)	P
Hemodiálise	71 (30,1)	29 (30,2)	42 (30,0)	1,01 (0,57 – 1,78)	0,9727	-	-
Co-morbidades	146 (61,9)	57 (59,4)	89 (63,6)	0,84 (0,49 – 1,43)	0,5144	-	-
Cardiopatia	60 (25,4)	27 (28,1)	33 (23,6)	1,27 (0,70 – 2,29)	0,4300	-	-
Neoplasia	36 (15,2)	09 (09,4)	27 (19,3)	0,43 (0,19 – 0,97)	0,0375	-	-
Diabetes mellitus	40 (16,9)	22 (22,9)	18 (12,9)	2,01 (1,01 – 4,00)	0,0430*	1,9907 (0,97 – 4,09)	0,0608
Nefropatia	66 (28,0)	28 (29,2)	38 (27,1)	1,10 (0,62 – 1,97)	0,7337	-	-
Uso prévio de antimicrobiano	195 (82,6)	82 (85,4)	113 (80,7)	1,40 (0,69 – 2,83)	0,3490	-	-
Carbapenêmicos	119 (50,4)	56 (58,3)	63 (45,0)	1,71 (1,01 – 2,89)	0,0442*	0,8928 (0,51 – 1,55)	0,6873
Fluoroquinolonas	51 (21,6)	24 (25,0)	27 (19,3)	1,41 (0,76 – 2,64)	0,2753	-	-
Cefalosporinas <sup>5</sup>	161 (68,2)	65 (67,7)	96 (68,6)	0,96 (0,55 – 1,68)	0,8888	-	-
Terapia inadequada	85 (36,0)	49 (51,0)	36 (25,7)	3,01 (1,73 – 5,23)	<0,0001*	3,0169 (1,72 – 5,31)	0,0001*
Mortalidade em 5 dias	54 (22,9)	25 (26,0)	28 (20,0)	1,408 (0,76 – 2,61)	0,2746	-	-
Mortalidade em 30 dias	99 (41,9)	42 (43,7)	57 (40,7)	1,133 (0,67 – 1,92)	0,6425	-	-

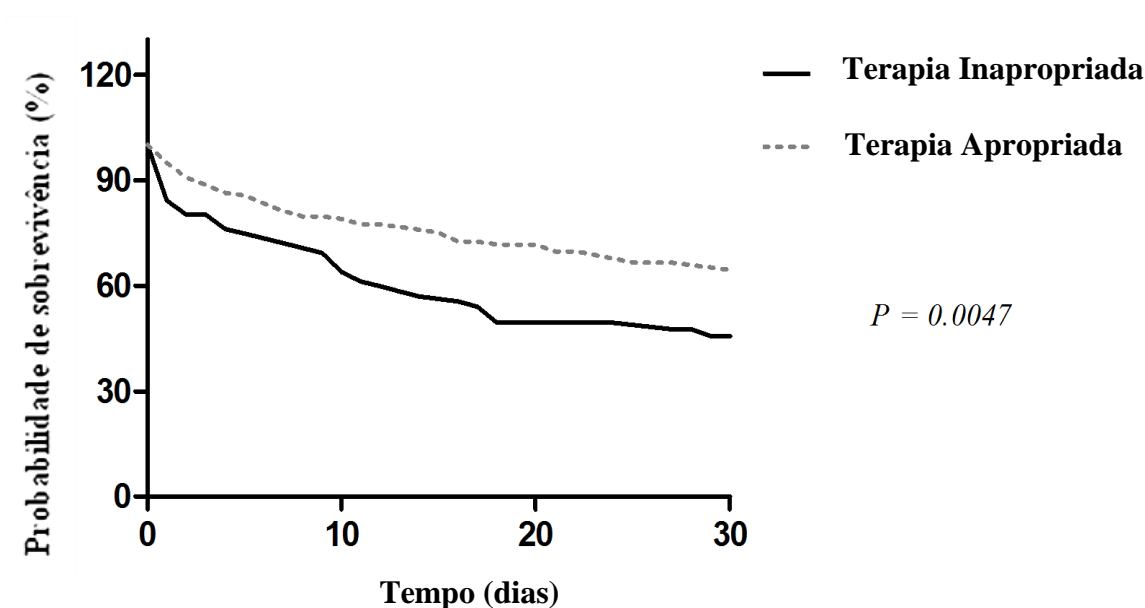
**Tabela 5** - Características dos pacientes, mortalidade e fatores de risco independentemente associados com infecções por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes

(conclusão)

Fatores de risco/ Características	Total n=236 (%)	MDR <sup>1</sup> n=96 (%)	não-MDR n= 140 (%)	Univariada		Multivariada	
				OR <sup>2</sup>	P	OR	P
				(CI <sup>3</sup> 95%)		(CI 95%)	
Mortalidade total	133 (56,4)	54 (56,2)	79 (56,4)	0,99 (0,59 – 1,68)	0,9783	-	-

<sup>1</sup>Multirresistente; <sup>2</sup>Odds Ratio; <sup>3</sup>Intervalo de confiança; <sup>4</sup>Desvio padrão; <sup>5</sup>Cefalosporina de 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> geração; \* $P \leq 0.05$  – estatisticamente significativo para fator de risco.





**Figura 2** - Curva de sobrevivência dos pacientes com infecções por *Pseudomonas aeruginosa* que receberam terapia antimicrobiana inapropriada em relação àqueles que receberam terapia antimicrobiana apropriada.

Dos 236 pacientes, 67% (158/236) apresentaram quadro de bacteremia por *P. aeruginosa*. Os dados da terapia antimicrobiana e evolução clínica de pacientes com bacteremia por *P. aeruginosa* estão descritas na **tabela 6**. O fator de risco significativa na análise univariada foi o tempo de hospitalização prolongado para os grupos de bacteremia por *P. aeruginosa* MDR ( $P=0,0022$ ) e resistente às fluoroquinolonas ( $P=0,0016$ ), sendo o último também independentemente associado quando da análise multivariada. Além disso, no grupo de bacteremia por amostras resistentes aos carbapenêmicos a mortalidade em 5 dias foi significativa.

A **tabela 7** mostra os dados de terapia antimicrobiana e evolução clínica de pacientes com PAV. Observou-se que a terapia antimicrobiana inapropriada foi significativa para os grupos de PAV por *P. aeruginosa* resistentes às fluoroquinolonas ( $P=0,0142$ ) e MDR ( $P=0,0385$ ).

**Tabela 6** - Terapia antimicrobiana e evolução clínica de pacientes com bacteremia causada por *Pseudomonas aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos, fluoroquinolonas e multirresistentes

(continua)

	Pacientes com	Pacientes sem	Univariada	
	Bacteremia	Bacteremia		
	n= 158 (%)	n= 78 (%)	<i>P</i>	OR <sup>1</sup> (CI <sup>2</sup> 95%)
<i>P. aeruginosa</i> resistente aos carbapenêmicos <sup>3</sup>				
Total	70 (100,0)	39 (100,0)	-	-
Mortalidade em 5 dias	22 (31,4)	05 (12,8)	0,0310*	3,117 (1,073 – 9,051)
Mortalidade em 30 dias	36 (51,4)	14 (35,9)	0,1188	1,891 (0,8453 – 4,229)
Terapia inapropriada	32 (45,7)	24 (61,5)	0,1131	0,5263 (0,2368 – 1,170)
Tempo de hospitalização prolongado <sup>5</sup>	40 (57,1)	15 (38,5)	0,0615	2,133 (0,9582 – 4,749)
<i>P. aeruginosa</i> resistente às fluoroquinolonas <sup>4</sup>				
Total	67 (100,0)	31 (100,0)	-	-
Mortalidade em 5 dias	21 (31,3)	04 (12,9)	0,0796	3,082 (0,9561 – 9,932)
Mortalidade em 30 dias	33 (49,2)	09 (29,0)	0,0600	2,373 (0,9534 – 5,904)
Terapia inapropriada	30 (44,8)	21 (67,7)	0,0343	0,3861 (0,1579 – 0,9440)
Tempo de hospitalização prolongado <sup>6</sup>	38 (56,7)	07 (22,6)	0,0016*	4,493 (1,701 – 11,86)
<i>P. aeruginosa</i> multirresistente				
Total	67 (100,0)	29 (100,0)	-	-

**Tabela 6** - Terapia antimicrobiana e evolução clínica de pacientes com bacteremia causada por *Pseudomonas aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos, fluoroquinolonas e multirresistentes

(conclusão)

	Pacientes com Bacteraemia n= 158 (%)	Pacientes sem Bacteraemia n= 78 (%)	Univariada	
			<i>P</i>	OR <sup>1</sup> (CI <sup>2</sup> 95%)
Mortalidade em 5 dias	21 (31,3)	04 (13,8)	0,0820	2,853 (0,8809 - 9,241)
Mortalidade em 30 dias	32 (47,8)	11 (37,9)	0,3738	1,496 (0,6141 – 3,645)
Terapia inapropriada	30 (44,8)	19 (65,5)	0,0620	0,4267 (0,1727 – 1,055)
Tempo de hospitalização prolongado	39 (58,2)	07 (24,1)	0,0022*	4,378 (1,644 – 11,66)

<sup>1</sup>Odds Ratio; <sup>2</sup>Intervalo de confiança; <sup>3</sup>Imipenem e/ou Meropenem; <sup>4</sup>Ciprofloxacina e/ou Norfloxacina; <sup>5</sup>Tempo de hospitalização  $\geq$  45 dias;

<sup>6</sup>Essa variável também foi fator independentemente associado em pacientes com MDR *P. aeruginosa*  $P=0.0088^*$ , OR=3.8151 (CI=1.40 - 10.38);

\* $P \leq 0.05$  – estatisticamente significante para os fatores de risco.

**Tabela 7** - Terapia antimicrobiana e evolução clínica de pacientes com PAV causada por *Pseudomonas aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos, fluoroquinolonas e multirresistentes

(continua)

	Pacientes com PAV <sup>6</sup> n= 60 (%)	Paciente sem PAV n= 168 (%)	Univariada	
			<i>P</i>	OR <sup>1</sup> (CI <sup>2</sup> 95%)
<i>P. aeruginosa</i> resistente aos carbapenêmicos <sup>3</sup>				
Total	28 (100,0)	75 (100,0)	-	-
Mortalidade em 5 dias	04 (14,3)	22 (29,3)	0,1348	0,4015 (0,1247 - 1,293)
Mortalidade em 30 dias	13 (46,4)	36 (48,0)	0,8870	0,9389 (0,3933 - 2,241)
Terapia Inapropriada	18 (63,3)	35 (46,7)	0,1114	2,057 (0,8393 - 5,042)
Tempo de Hospitalização Prolongado <sup>5</sup>	09 (32,1)	41 (54,7)	0,0419	0,3928 (0,1574 - 0,9802)
<i>P. aeruginosa</i> resistente às fluoroquinolonas <sup>4</sup>				
Total	13 (100,0)	77 (100)	-	-
Mortalidade em 5 dias	02 (15,4)	21 (27,3)	0,5024	0,4848 (0,09904 - 2,374)
Mortalidade em 30 dias	07 (53,8)	33 (42,9)	0,4608	1,556 (0,4778 - 5,065)
Terapia Inapropriada	11 (84,6)	35 (45,4)	0,0142*	6,600 (1,370 - 31,80)
Tempo de Hospitalização Prolongado	02 (15,4)	39 (50,6)	0,0321	0,1772 (0,03679 - 0,8531)
<i>P. aeruginosa</i> multirresistente				
Total	14 (100,0)	73 (100,0)	-	-

**Tabela 7** - Terapia antimicrobiana e evolução clínica de pacientes com PAV causada por *Pseudomonas aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos, fluoroquinolonas e multirresistentes

(conclusão)

	Pacientes com PAV <sup>6</sup> n= 60 (%)	Paciente sem PAV n= 168 (%)	Univariada	
			<i>P</i>	OR <sup>1</sup> (CI <sup>2</sup> 95%)
Mortalidade em 5 dias	02 (14,3)	21 (28,8)	0,3372	0,4127 (0,08494 - 2,005)
Mortalidade em 30 dias	08 (57,1)	32 (43,8)	0,3601	1,708 (0,5380 - 5,424)
Terapia Inapropriada	11 (78,6)	33 (45,2)	0,0385*	4,444 (1,143 - 17,27)
Tempo de Hospitalização Prolongado	02 (14,3)	40 (54,8)	0,0074	0,1375 (0,02870 - 0,6587)

<sup>1</sup>Odds Ratio; <sup>2</sup>Intervalo de confiança; <sup>3</sup>Imipenem e/ou Meropenem; <sup>4</sup>Ciprofloxacina e/ou Norfloxacin; <sup>5</sup>Tempo de hospitalização  $\geq 45$  dias;

<sup>6</sup>Pneumonia associada à ventilação mecânica; \* $P \leq 0.05$  – estatisticamente significativa para os fatores de risco.

Os espécimes clínicos das amostras de *P aeruginosa*, bem como sua distribuição entre as unidades hospitalares do HC-UFU estão descritos na **tabela 8**. Do total de 242 episódios incluídos no estudo, 67,4% foram recuperados do sangue/ponta de cateter venoso central, e 28,1% de secreção traqueal. Do total de 242 episódios, 29,3% ocorreram na Unidade de Terapia Intensiva de adultos, seguido de Clínica Médica e Unidades Cirúrgicas/Traumatologia.

**Tabela 8** - Frequência de episódios de infecção e de pacientes com infecções por *Pseudomonas aeruginosa*, no HC-UFU, no período de 2009-2012 e 2014

Espécime clínico	<i>P. aeruginosa</i>	
	Pacientes n=236 (%)	Episódios n=242 (%)
Sangue/Ponta de Cateter Venoso Central	158 (66,9)	163 (67,4)
Secreção Traqueal	68 (28,8)	68 (28,1)
Urina	05 (2,1)	06 (2,5)
Fragmento de tecido	04 (1,7)	04 (1,6)
Secreção de ouvido	01 (0,4)	01 (0,4)
Enfermaria	n=236 (%)	n=242 (%)
Unidade de Terapia Intensiva de Adultos	71 (30,1)	71 (29,3)
Unidade de Terapia Intensiva Neonatal	04 (01,7)	04 (01,7)
Cirúrgica/Traumatologia <sup>1</sup>	63 (26,7)	64 (26,4)
Clínica Médica <sup>2</sup>	63 (26,7)	67 (27,7)
Ambulatório <sup>3</sup>	04 (01,7)	05 (02,1)
Oncologia/Quimioterapia	14 (05,9)	14 (05,8)
Outros <sup>4</sup>	17 (07,2)	17 (07,0)

<sup>1</sup>Cirúrgica I, II e III; <sup>2</sup>Moléstia Infecçiosa, Pediatria Geral, Ginecologia/Obstetrícia; <sup>3</sup>Central, Jaraguá, Diálise e Oncologia; <sup>4</sup>Pronto Atendimento Médico, Psiquiatria e Transplante.

Os resultados dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos entre os 242 episódios das amostras de *P. aeruginosa* são mostrados na **tabela 9**. A resistência aos carbapenêmicos e fluoroquinolonas foram as mais frequentes, com 45,9% e 42,6%, respectivamente, seguindo-se a dos aminoglicosídeos (38,4%), cefalosporinas (3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup>

geração) (34,3%) e piperacilina/tazobactam (24,8%), e nenhuma amostra foi resistente à polimixina.

**Tabela 9** - Perfis de resistência entre 242 amostras de *Pseudomonas aeruginosa*

Antimicrobiano	Resistente	
	Amostras	Frequências (%)
Cefalosporinas	83	34,3
Carbapenêmicos	111	45,9
Aminoglicosídeos	93	38,4
Polimixina	0	0
Piperacilina/Tazobactam	60	24,8
Fluoroquinolona	103	42,6

A **tabela 10** resume os dados de 40 amostras de *P. aeruginosa* resistentes às fluoroquinolonas e/ou carbapenêmicos (80%), sendo 87,5% (35/40) de origem hospitalar e 12,5% (05/40) associado às infecções adquiridas na comunidade, recuperados dos seguintes espécimes clínicos: sangue (52,5%), secreção traqueal (20,0%), urina (15,0%), fragmento de tecido (10,0%) e secreção de ouvido (2,5%). Todos os pacientes com infecção de corrente sanguínea estavam com cateter venoso central, e em 50,0% daqueles com infecções urinárias a sonda vesical estava presente. Além disso, em 86,7% dos pacientes com pneumonia esta era associada à ventilação mecânica (PAV) (dados não mostrados). A análise dos dados do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos evidenciou que a maioria (87,5%; 35/40) das amostras apresentaram o fenótipo MDR, e destes 40,0% apresentaram origem comunitária. As frequências de resistência aos carbapenêmicos, cefepime, piperacilina/tazobactam, e aminoglicosídeos foram 80,0%, 72,5%, 57,5% e 55,0%, respectivamente (dados não demonstrados). A concentração inibitória mínima para imipenem e ciprofloxacina para inibir 90,0% das 38 amostras foi de  $\geq 32$  e 64  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Não foi possível determinar a CIM para duas amostras de *P. aeruginosa*.

O PCR multiplex para metalo- $\beta$ -lactamase foi realizado para 32 amostras de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos associados a infecções hospitalares e comunitárias, com 85,7% (30/35) e 40,0% (2/5), respectivamente, e 7 amostras apresentaram *amplicon* consistente com genes MBL, identificados como do tipo *bla<sub>SPM</sub>* e *bla<sub>VIM</sub>*.

No total, a frequência das amostras que apresentaram genes PMQR (*qnrS<sub>I</sub>* e *aac(6')-Ib-cr*) foi de 5,3% (2/38), sem que o sequenciamento de genes PMQR ocorresse em duas amostras. A amostra MDR de origem hospitalar que apresentou o gene *qnrS<sub>I</sub>* foi recuperado de pneumonia e apresentou CIMs para ciprofloxacina e imipenem, de 64 µg/mL e ≥32 µg/mL, respectivamente. Essa amostra foi negativa para os genes MBL. No total, a partir da técnica de PCR, verificou-se que a maioria das amostras testadas apresentaram o gene *aac(6')-Ib* (85,0%; 34/40), recuperados dos seguintes espécimes clínicos: sangue (38,2%), aspirado traqueal (32,4%), urina (17,6%) e fragmento de tecido (11,8%). O resultado do sequenciamento do DNA mostrou que apenas uma amostra de origem hospitalar, proveniente de fragmento de tecido e não-MDR, apresentou a variante cr (gene *aac(6')-Ib-cr*), com CIM de 64 µg/mL para ciprofloxacina. Independentemente da presença de genes PMQR a CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> para ambos ciprofloxacina e imipenem foram muito altas. Além disso, surpreendentemente, 87,5% (28/32) das amostras albergando o gene *aac(6')-Ib* comportaram-se como da variante *aac(6')-Ib<sub>7</sub>*. Nenhuma das amostras testadas apresentou os genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, e *qepA*, e/ou a coexistência destes na mesma amostra. Além disso, nenhum dos isolados positivos para os determinantes PMQR tiveram origem comunitária (**Tabela 10 e Tabela suplementar 1 – Apêndice B**).

Ainda na **tabela 10** observa-se que a frequência de amostras carreando o gene *intI* (integron de classe 1) foi de 90%, e aqueles que não apresentaram este gene também não possuía *amplicon* consistente com genes PMQR ou *aac(6')-Ib*.

No total, 17 padrões de PFGE (A-Q) de *P. aeruginosa* foram observados entre as 21 amostras analisadas, com predomínio de um perfil policlonal, contudo com três clones principais, sendo: A (14,3%), B (9,5%), C (9,5%) (**Tabela 10 e Figura 3**). O pulsotipo A apresentou dois subtipos (A e A1), sendo a maioria correspondente as amostras positivas para o gene *bla<sub>SPM</sub>*, enquanto que as linhagens definidas como B e C apresentaram apenas um subtipo.



**Tabela 10** - Caracterização de 40 amostras de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes às fluoroquinolonas e/ou carbapenêmicos em relação à concentração inibitória mínima, genes *bla<sub>SPM</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr*, *aac(6')-Ib<sub>7</sub>*, *intI*, e pulsotipos obtidos por PFGE

(continua)

Amostras	Origem	Espécime	Fenótipo	CIM <sup>2</sup> (ug/mL)		MBL <sup>3</sup>	PMQR <sup>4</sup>	Integron Classe 1	PFGE <sup>6</sup>
				IMP <sup>7</sup>	CIP <sup>8</sup>				
10	Comunitária	Urina	MDR <sup>1</sup>	>32	64	- <sup>9</sup>	<i>aac(6')-Ib<sub>7</sub></i>	<i>intI</i>	Q
17	Comunitária	Urina	MDR	>32	256	-	<i>aac(6')-Ib<sub>7</sub></i>	<i>intI</i>	D
114	Comunitária	Urina	não-MDR	1,0	128	ND	<i>aac(6')-Ib<sub>7</sub></i>	<i>intI</i>	O
148	Comunitária	Fragmento de Tecido	não-MDR	1,0	02	ND	<i>aac(6')-Ib<sub>7</sub></i>	<i>intI</i>	N
160	Comunitária	Urina	não-MDR	0,75	16	ND	<i>aac(6')-Ib<sub>7</sub></i>	<i>intI</i>	M
03	Hospitalar	Fragmento de Tecido	MDR	>32	16	-	<i>aac(6')-Ib<sub>7</sub></i>	<i>intI</i>	B
43	Hospitalar	Fragmento de Tecido	não-MDR	0,25	64	ND	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>intI</i>	F
90	Hospitalar	Pulmão	MDR	0,75	64	ND	-	<i>intI</i>	ND
94	Hospitalar	Pulmão	MDR	>32	64	-	<i>qnrS</i> , <i>aac(6')-Ib<sub>7</sub></i>	<i>intI</i>	P
113	Hospitalar	Sangue	MDR	>32	32	-	<i>aac(6')-Ib<sub>7</sub></i>	<i>intI</i>	G
124	Hospitalar	Pulmão	MDR	1,5	02	-	-	-	ND
132	Hospitalar	Fragmento de Tecido	MDR	>32	32	-	<i>aac(6')-Ib<sub>7</sub></i>	<i>intI</i>	C
145	Hospitalar	Urina	MDR	>32	32	-	<i>aac(6')-Ib<sub>7</sub></i>	<i>intI</i>	I
156	Hospitalar	Urina	MDR	0,75	16	ND	<i>aac(6')-Ib</i>	<i>intI</i>	C

**Tabela 10** - Caracterização de 40 amostras de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes às fluoroquinolonas e/ou carbapenêmicos em relação à concentração inibitória mínima, genes *bla<sub>SPM</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr*, *aac(6')-Ib<sub>7</sub>*, *intI*, e pulsotipos obtidos por PFGE

(continuação)

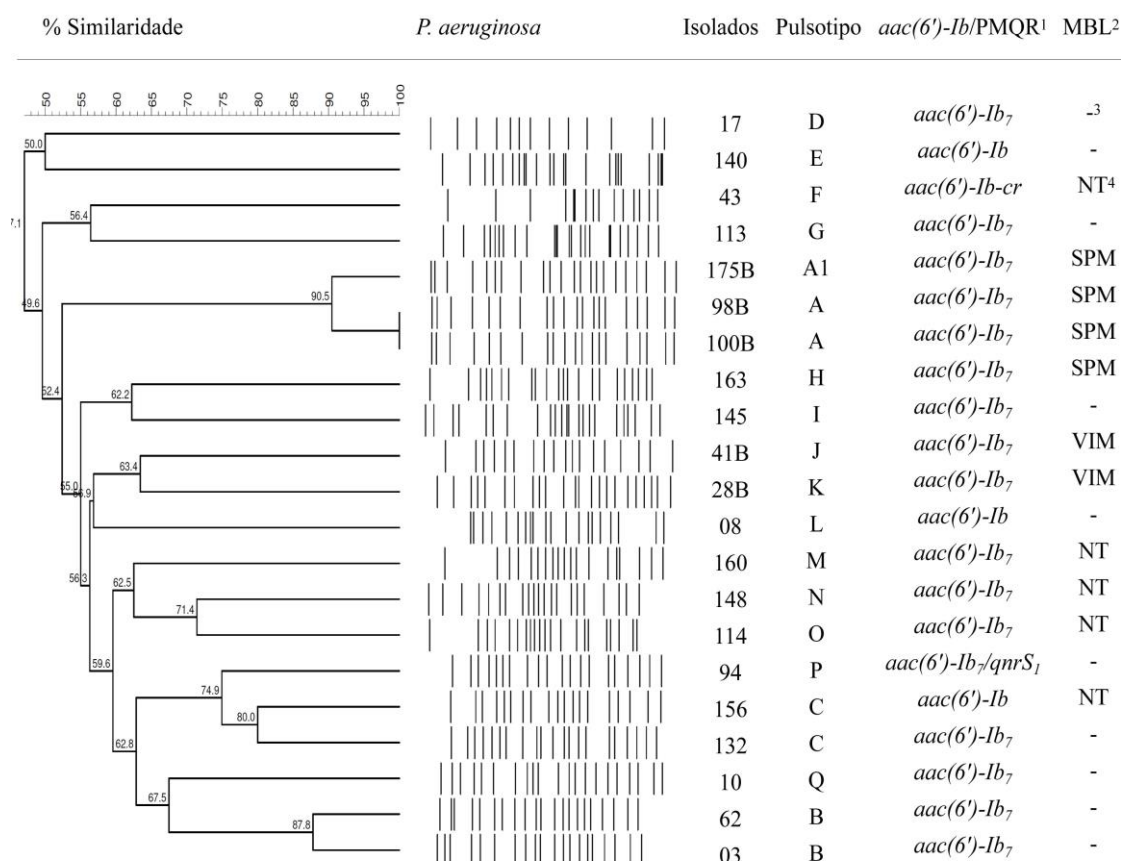
Amostras	Origem	Espécime	Fenótipo	CIM <sup>2</sup> (ug/mL)		MBL <sup>3</sup>	PMQR <sup>4</sup>	Integron Classe 1	PFGE <sup>6</sup>
				IMP <sup>7</sup>	CIP <sup>8</sup>				
163	Hospitalar	Pulmão	MDR	>32	32	SPM	<i>aac(6')-Ib<sub>7</sub></i>	<i>intI</i>	H
08	Hospitalar	Pulmão	MDR	>32	16	-	<i>aac(6')-Ib</i>	<i>intI</i>	L
58	Hospitalar	Secreção de Ouvido	não-MDR	2,0	04	ND	-	-	ND
62	Hospitalar	Pulmão	MDR	>32	32	-	<i>aac(6')-Ib<sub>7</sub></i>	<i>intI</i>	B
71	Hospitalar	Pulmão	MDR	>32	16	-	-	-	ND
140	Hospitalar	Pulmão	MDR	0,75	16	ND	<i>aac(6')-Ib</i>	<i>intI</i>	E
7P	Hospitalar	Pulmão	MDR	12,0	32	-	<i>aac(6')-Ib<sub>7</sub></i>	<i>intI</i>	ND
49P	Hospitalar	Pulmão	MDR	>32	16	-	<i>aac(6')-Ib<sub>7</sub></i>	<i>intI</i>	ND
61P	Hospitalar	Pulmão	MDR	>32	16	-	<i>aac(6')-Ib<sub>7</sub></i>	<i>intI</i>	ND
69P	Hospitalar	Pulmão	MDR	>32	64	-	<i>aac(6')-Ib*</i>	<i>intI</i>	ND
75P	Hospitalar	Pulmão	MDR	>32	16	-	<i>aac(6')-Ib<sub>7</sub></i>	<i>intI</i>	ND
76P	Hospitalar	Pulmão	MDR	-	-	-	<i>aac(6')-Ib<sub>7</sub></i>	<i>intI</i>	ND
125P	Hospitalar	Pulmão	MDR	1,0	02	-	-	-	ND
28RB	Hospitalar	Sangue	MDR	>32	32	-	<i>aac(6')-Ib<sub>7</sub></i>	<i>intI</i>	ND
28B	Hospitalar	Sangue	MDR	>32	16	VIM	<i>aac(6')-Ib<sub>7</sub></i>	<i>intI</i>	K
39B	Hospitalar	Sangue	MDR	>32	16	-	<i>aac(6')-Ib<sub>7</sub></i>	<i>intI</i>	ND

**Tabela 10** - Caracterização de 40 amostras de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes às fluoroquinolonas e/ou carbapenêmicos em relação à concentração inibitória mínima, genes *bla*<sub>SPM</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *qnrS*, *aac*(6')-*Ib-cr*, *aac*(6')-*Ib*<sub>7</sub>, *intI*, e pulsotipos obtidos por PFGE

(conclusão)

Amostras	Origem	Espécime	Fenótipo	CIM <sup>2</sup> (ug/mL)		MBL <sup>3</sup>	PMQR <sup>4</sup>	Integron Classe 1	PFGE <sup>6</sup>
				IMP <sup>7</sup>	CIP <sup>8</sup>				
41B	Hospitalar	Sangue	MDR	>32	16	VIM	<i>aac</i> (6')- <i>Ib</i> <sub>7</sub>	<i>intI</i>	J
83B	Hospitalar	Sangue	MDR	>32	32	SPM	<i>aac</i> (6')- <i>Ib</i> <sub>7</sub>	<i>intI</i>	ND
98B	Hospitalar	Sangue	MDR	>32	16	SPM	<i>aac</i> (6')- <i>Ib</i> <sub>7</sub>	<i>intI</i>	A
100B	Hospitalar	Sangue	MDR	>32	16	SPM	<i>aac</i> (6')- <i>Ib</i> <sub>7</sub>	<i>intI</i>	A
117B	Hospitalar	Sangue	MDR	>32	16	-	<i>aac</i> (6')- <i>Ib</i> <sub>7</sub>	<i>intI</i>	ND
139B	Hospitalar	Sangue	MDR	-	-	-	<i>aac</i> (6')- <i>Ib</i> *	<i>intI</i>	ND
149B	Hospitalar	Sangue	MDR	>32	16	-	<i>aac</i> (6')- <i>Ib</i> <sub>7</sub>	<i>intI</i>	ND
152B	Hospitalar	Sangue	MDR	16,0	32	-	-	<i>intI</i>	ND
175B	Hospitalar	Sangue	MDR	>32	16	SPM	<i>aac</i> (6')- <i>Ib</i> <sub>7</sub>	<i>intI</i>	A1
176B	Hospitalar	Sangue	MDR	>32	16	-	<i>aac</i> (6')- <i>Ib</i> <sub>7</sub>	<i>intI</i>	ND

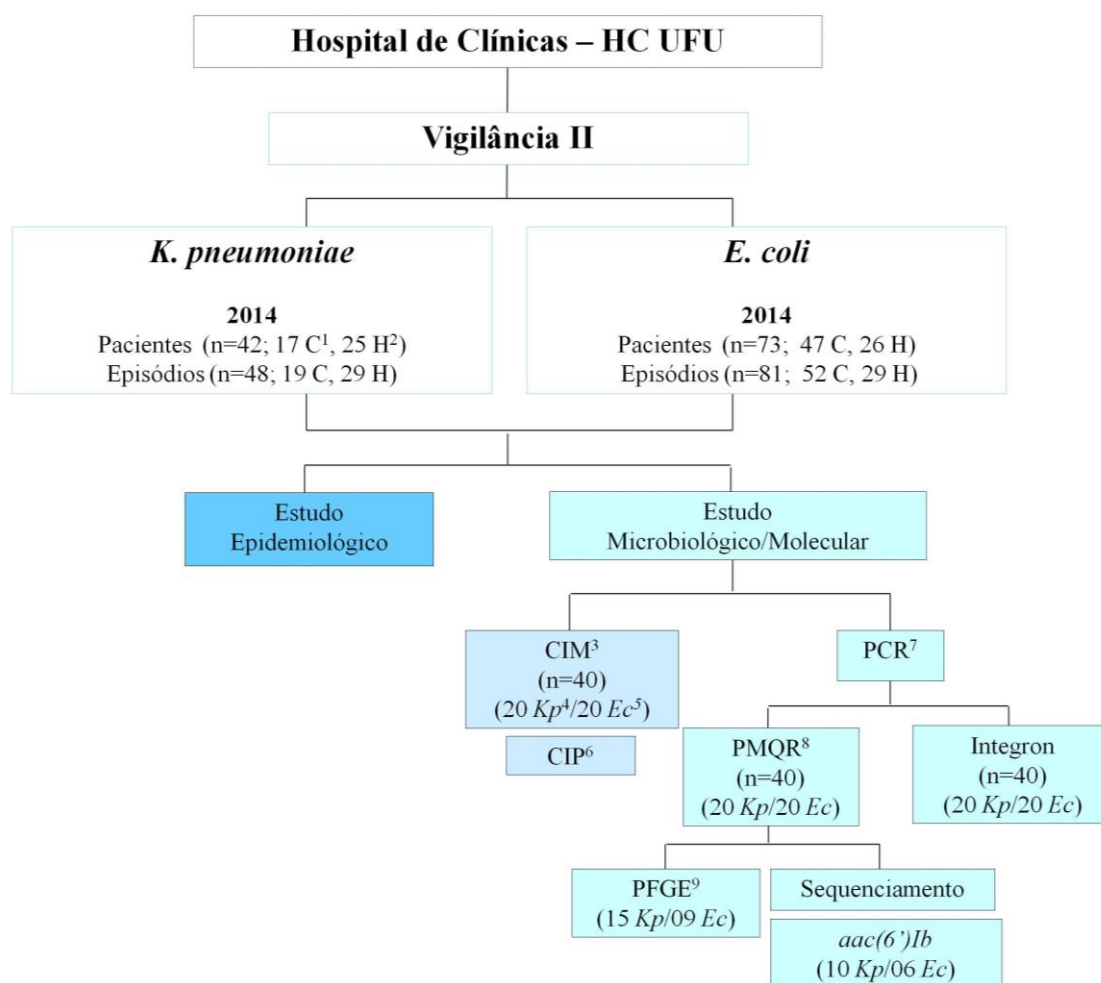
<sup>1</sup>Multirresistente; <sup>2</sup>Concentração inibitória mínima; <sup>3</sup>Metalo-β-lactamase; <sup>4</sup>Plasmid-mediated quinolone resistance; <sup>5</sup>Quinolone-resistance determining region; <sup>6</sup>Pulsed field gel electrophoresis; <sup>7</sup>Imipenem; <sup>8</sup>Ciprofloxacin; <sup>9</sup>Negativo; <sup>10</sup>Não determinado; \*Não foi possível fazer a leitura do sequenciamento.



**Figura 3** - Dendrograma dos perfis de *Pulsed-field Gel Electrophoresis* (PFGE), e de resistência das amostras de *Pseudomonas aeruginosa*. Escala representa as porcentagens de similaridade. <sup>1</sup>Aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase type Ib e/ou Plasmid-mediated quinolone resistance; <sup>2</sup>Metallo-β-lactamase; <sup>3</sup>negativo; <sup>4</sup>não testado.

#### 4.2. Vigilância II: Infecções por *K. pneumoniae* e *E. coli* resistentes às fluoroquinolonas

Na vigilância epidemiológica de infecções hospitalares e comunitárias por *K. pneumoniae* e *E. coli*, foram detectados 129 episódios (48 por *K. pneumoniae* e 81 por *E. coli*) em 115 pacientes (42 por *K. pneumoniae* e 73 por *E. coli*) atendidos no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, no período de abril a outubro de 2014. O estudo epidemiológico-molecular e os experimentos realizados estão descritos na **figura 4**.



**Figura 4** - Organograma da população estudada: infecções por *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*. <sup>1</sup>Infecções comunitárias; <sup>2</sup>Infecções hospitalares; <sup>3</sup>Concentração inibitória mínima; <sup>4</sup>*K. pneumoniae*; <sup>5</sup>*E. coli*; <sup>6</sup>Ciprofloxacina; <sup>7</sup>Reação em Cadeia da Polimerase; <sup>8</sup>Plasmid-mediated quinolone resistance; <sup>9</sup>Pulsed field gel electrophoresis. Não foi possível avaliar se havia a presença do gene *aac(6')-Ib* em uma amostra de cada espécie.

As características clínicas e demográficas da população estudada estão na **tabela 11**, incluindo a idade média dos pacientes com infecção hospitalar (48,7 anos, variação de 0 – 87), com a maioria do sexo masculino (58,8%), e um tempo médio de internação de 50,7 dias, enquanto entre aqueles com infecção comunitária a média do tempo de hospitalização foi de 5,3 dias. Aproximadamente 22% dos pacientes do primeiro grupo internaram na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) em algum momento, e apresentaram mais de uma co-morbidade, destacando-se derrame (≈50,0%) e nefropatia (39,2%). Frequências semelhantes dessas co-morbidades foram observadas também nos pacientes com infecções comunitárias, de 46,9% e 45,3%, respectivamente. As infecções urinárias predominaram tanto no grupo hospitalar (47,1%), quanto no comunitário (95,3%), seguidas por sepse, com 33,3% e 4,7%,

respectivamente. Não foi observado nenhum episódio de pneumonia no segundo grupo. A presença de cirurgia (56,9%) e o uso de procedimentos invasivos foram frequentes na população com infecção hospitalar, com destaque para cateter venoso central (52,9%), sonda nasogástrica ou nasoenteral (37,2%), traqueostomia (27,4%) e ventilação mecânica (25,5%). Enquanto entre as comunitárias a frequência foi maior para uso de cateter venoso central (14,1%) e sonda vesical (10,9%). A maioria dos pacientes com infecção hospitalar fez uso prévio de antimicrobiano (66,7%) e apresentaram uma frequência de mortalidade total e de 30 dias de 29,4% e 19,6%, respectivamente.

A terapia antimicrobiana apropriada ou inapropriada e a mortalidade entre os pacientes com infecções hospitalares por estes bacilos Gram-negativos estão descritas na **tabela 12**. A terapia antimicrobiana foi considerada inapropriada na maioria (56,9%, correspondendo a 60% naquelas por *K. pneumoniae* e 53,8% por *E. coli*). O resultado deste estudo mostrou também que 15 pacientes evoluíram para óbito durante o período de internação, sendo que 46,7% destes receberam terapia inapropriada, com destaque para os casos de sepse (57,1%) (dados não demonstrados).

**Tabela 11** - Características demográficas, clínicas e mortalidade de 115 pacientes com infecção hospitalar ou comunitária por *Klebsiella pneumoniae* ou *Escherichia coli* atendidos no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia

(continua)

<b>Variáveis</b>	<b>Infecção Hospitalar n= 51 (%)</b>	<b>Infecção Comunitária* n= 64 (%)</b>
<b>Sexo</b> (Feminino/Masculino)	21 (41,2) / 30 (58,8)	30 (46,9) / 34 (53,1)
<b>Tempo hospitalização, dias</b> – Média / (Variação)	50,7 (5-423)	5,3 (0-108)
<b>Idade, anos</b> – Média / (Variação)	48,7 (0-87)	55,1 (0-93)
<b>Internação em UTI<sup>1</sup></b>	11 (21,6)	-
<b>Co-morbidades</b>		
Cardiopatía	18 (35,3)	15 (23,4)
Nefropatia	20 (39,2)	29 (45,3)
Neoplasia	15 (29,4)	29 (45,3)
Diabetes	15 (29,4)	20 (31,2)
Vascular/Derrame	24 (47,1)	30 (46,9)
<b>Infecção/Sítio Anatômico</b>		
Trato Urinário	24 (47,1)	61 (95,3)
Corrente Sanguínea	17 (33,3)	03 (04,7)
Pneumonia	05 (09,8)	-
Outros <sup>2</sup>	05 (09,8)	-

**Tabela 11** - Características demográficas, clínicas e mortalidade de 115 pacientes com infecção hospitalar ou comunitária por *Klebsiella pneumoniae* ou *Escherichia coli* atendidos no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia

(conclusão)

Variáveis	Infecção Hospitalar n= 51 (%)	Infecção Comunitária* n= 64 (%)
<b>Uso de Procedimentos Invasivos</b>		
Cateter Venoso Central	27 (52,9)	09 (14,1)
Ventilação Mecânica	13 (25,5)	01 (01,6)
Sonda Vesical	11 (21,6)	07 (10,9)
Traqueostomia	14 (27,4)	02 (03,1)
Sonda Nasoenteral/Nasogástrica	19 (37,2)	02 (03,1)
Nutrição Parenteral	03 (05,9)	01 (01,6)
Hemodiálise	11 (21,6)	06 (09,4)
<b>Cirurgia</b>	29 (56,9)	24 (37,5)*
<b>Uso prévio de Antibióticos</b>	34 (66,7)	05 (07,8)
<b>Mortalidade em 30 dias</b>	10 (19,6)	03 (04,7)
<b>Mortalidade total</b>	15 (29,4)	03 (04,7)

<sup>1</sup>Unidade de Terapia Intensiva; <sup>2</sup>Ferida operatória, Fragmento (ósseo e tecido), Secreção (abdominal e ouvido) e Líquido ascítico/peritoneal; - Frequência igual à zero. \*A amostra foi recuperada em até 48 horas após a admissão no hospital.



**Tabela 12** - Terapia antimicrobiana apropriada ou inapropriada e evolução clínica de pacientes com infecções hospitalares por amostras de *Klebsiella pneumoniae* ou *Escherichia coli* resistentes às fluoroquinolonas

	<b>Total</b>	<b>Óbito</b>	<b>Alta</b>	<b>Univariada</b>	
	<b>n= 51</b>	<b>n= 15</b>	<b>n= 36</b>	<b>P</b>	<b>OR<sup>1</sup></b>
	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>		<b>(CI<sup>2</sup> 95%)</b>
<i>K. pneumoniae</i>					
Total	25 (49,0)	06 (40,0)	19 (52,8)		
Terapia Inapropriada	15 (60,0)	03 (50,0)	12 (63,2)	0,6532	0,5833 (0,09150 - 3,719)
<i>E. coli</i>					
Total	26 (51,0)	09 (60,0)	17 (47,2)		
Terapia Inapropriada	14 (53,8)	04 (44,4)	10 (58,8)	0,6828	0,5600 (0,1095 - 2,863)

A distribuição dos episódios de infecção de natureza hospitalar e comunitária de pacientes com infecção por *K. pneumoniae* e *E. coli* entre os diferentes espécimes clínicos e unidades hospitalares do HC-UFU está descrita na **tabela 13**. No total, predominaram as infecções urinárias (72,9%), proveniente principalmente de ambulatórios, com destaque para as infecções comunitárias (44,7%). O sangue foi o segundo espécime mais frequente (17,8%), enquanto o aspirado pulmonar representou apenas 3,9% com 80% das amostras provenientes da UTI de adultos. Houve predominância de amostras hospitalares nas Clínicas Cirúrgicas (27,6%), seguindo-se a Clínica Médica (25,9%), o que não foi observado naqueles comunitários, que prevaleceram em ambulatórios (54,9%). O principal agente etiológico das infecções comunitárias foi a *E. coli* (64,2%), enquanto *K. pneumoniae* predominou entre as infecções hospitalares (60,4%).

Do total de episódios de *K. pneumoniae* e *E. coli*, predominaram as infecções urinárias (72,9%; 94/129), em pacientes do sexo feminino (52,1%), com idade acima de 60 anos (53,2%) (**Tabela 14**).

**Tabela 13** - Frequência de amostras de origem hospitalar e comunitária recuperados de pacientes com infecção por *Klebsiella pneumoniae* ou *Escherichia coli* resistentes às fluoroquinolonas, de diferentes espécimes clínicos e unidades do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia

(continua)

		Micro-organismos n=129 (%)				
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>		<i>Escherichia coli</i>		
		n= 48 (37,2%)		n= 81 (62,8%)		TOTAL
Espécime	Unidade	Hospitalar	Comunitária	Hospitalar	Comunitária	
Clínico		n=29 (60,4)	n=19 (39,6)	n=29 (35,8)	n=52 (64,2)	
Secreção	UTI Adulto <sup>3</sup>	02 (100,0)	-	02 (66,7)	-	04 (80,0)
Traqueal	Sala de Emergência	-	-	01 (33,3)	-	01 (20,0)
	<b>Total</b>	<b>02 (06,9)</b>	<b>-</b>	<b>03 (10,3)</b>	<b>-</b>	<b>05 (03,9)</b>
Sangue e	Clínica Médica <sup>4</sup>	01 (11,1)	-	02 (18,2)	02 (100,0)	05 (21,7)
Ponta de	Cirúrgica/Trauma <sup>5</sup>	01 (11,1)	-	02 (18,2)	-	03 (13,0)
CVC <sup>1</sup>	UTI Adulto	03 (33,3)	-	-	-	03 (13,0)
	Ambulatórios <sup>6</sup>	-	01 (100,0)	01 (09,1)	-	02 (08,7)
	Sala de Emergência	02 (22,2)	-	-	-	02 (08,7)
	Unidade de dor torácica	01 (11,1)	-	-	-	01 (04,3)
	Oncologia/Quimioterapia	01 (11,1)	-	05 (45,5)		06 (26,1)
	Berçário	-	-	01 (09,1)	-	01 (04,3)
	<b>Total</b>	<b>09 (31,0)</b>	<b>01 (05,3)</b>	<b>11 (37,9)</b>	<b>02 (03,8)</b>	<b>23 (17,8)</b>

**Tabela 13** - Frequência de amostras de origem hospitalar e comunitária recuperados de pacientes com infecção por *Klebsiella pneumoniae* ou *Escherichia coli* resistentes às fluoroquinolonas, de diferentes espécimes clínicos e unidades do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia

(continuação)

		Micro-organismos n=129 (%)				
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>		<i>Escherichia coli</i>		
		n= 48 (37,2%)		n= 81 (62,8%)		TOTAL
Espécime	Unidade	Hospitalar	Comunitária	Hospitalar	Comunitária	
Clínico		n=29 (60,4)	n=19 (39,6)	n=29 (35,8)	n=52 (64,2)	
Secreção	Clínica Médica	01 (100,0)	-	-	-	01 (100,0)
Cirúrgica	<b>Total</b>	<b>01 (03,4)</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>01 (00,8)</b>
Urina	Clínica Médica	03 (21,4)	03 (16,7)	04 (33,3)	07 (14,0)	17 (18,1)
	Cirúrgica/Trauma	08 (57,1)	02 (11,1)	02 (16,7)	09 (18,0)	21 (22,3)
	Ambulatórios	02 (14,3)	09 (50,0)	02 (16,7)	29 (58,0)	42 (44,7)
	Sala de Emergência	-	01 (05,5)	01 (08,3)	-	02 (02,1)
	Unidade de dor torácica	-	01 (05,5)	02 (16,7)	-	03 (03,2)
	Oncologia/Quimioterapia	01 (07,1)	01 (05,5)	-	-	02 (02,1)
	Núcleo de Saúde do Servidos	-	01 (05,5)	-	01 (02,0)	02 (02,1)

**Tabela 13** - Frequência de amostras de origem hospitalar e comunitária recuperados de pacientes com infecção por *Klebsiella pneumoniae* ou *Escherichia coli* resistentes às fluoroquinolonas, de diferentes espécimes clínicos e unidades do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia

(conclusão)

		Micro-organismos n=129 (%)				
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>		<i>Escherichia coli</i>		
		n= 48 (37,2%)		n= 81 (62,8%)		TOTAL
Espécime	Unidade	Hospitalar	Comunitária	Hospitalar	Comunitária	
Clínico		n=29 (60,4)	n=19 (39,6)	n=29 (35,8)	n=52 (64,2)	
	Berçário	-	-	01 (08,3)	-	01 (01,1)
	Programa de Atendimento Domiciliar	-	-	-	01 (02,0)	01 (01,1)
	Pronto Atendimento Médico	-	-	-	03 (06,0)	03 (03,2)
	Total	14 (48,3)	18 (94,7)	12 (41,4)	50 (96,2)	94 (72,9)
	Outros <sup>2</sup>					
	Clínica Médica	01 (33,3)	-	02 (66,7)	-	03 (50,0)
	Cirúrgica/Trauma	02 (66,7)	-	01 (33,3)	-	03 (50,0)
	Total	03 (10,3)	-	03 (10,3)	-	06 (04,6)

<sup>1</sup>Cateter Venoso Central; <sup>2</sup>Líquido ascítico/peritoneal, Fragmento ósseo, Fragmento de tecido, Secreção abdominal; <sup>3</sup>Unidade de Terapia Intensiva; <sup>4</sup>Moléstia Infecciosa, Pediatria Geral, Ginecologia/Obstetrícia; <sup>5</sup>Cirúrgica I, II e III; <sup>6</sup>Central, Jaraguá, Diálise e Oncologia; - Frequência igual à zero.

**Tabela 14** - Episódios de infecções por amostras de *Klebsiella pneumoniae* ou *Escherichia coli* recuperadas de infecções urinárias hospitalares ou comunitárias

Micro-organismo/Característica	Infecções urinárias		
	Total n= 94 (%)	Hospitalar n= 26 (%)	Comunitária n= 68 (%)
<i>K. pneumoniae</i>	<b>32 (34,0)</b>	<b>14 (53,8)</b>	<b>18 (26,5)</b>
Sexo feminino	15 (46,9)	09 (64,3)	06 (33,3)
Idade ≥ 60 anos	19 (59,4)	07 (50,0)	12 (66,7)
<i>E. coli</i>	<b>62 (66,0)</b>	<b>12 (46,2)</b>	<b>50 (73,5)</b>
Sexo feminino	34 (54,8)	08 (66,7)	26 (52,0)
Idade ≥ 60 anos	31 (50,0)	07 (58,3)	24 (48,0)

A **tabela 15** resume o perfil de resistência aos antimicrobianos de amostras de *K. pneumoniae* e *E. coli* resistentes às fluoroquinolonas. A frequência de resistência de *K. pneumoniae* de origem hospitalar foi superior a 75% para cinco dos antimicrobianos testados (Ampicilina-100%; Cefepime-100%; Ceftriaxona-100%; Piperacilina/Tazobactam-93,1%; e Gentamicina-75,9%), enquanto para *E. coli* foi de 86,2% para Ampicilina, 44,8% Ampicilina/Sulbactam, e 41,4% para Cefepime e Ceftriaxona. No que se refere a amostras de *K. pneumoniae* de natureza comunitária a resistência foi elevada para ampicilina (100%), nitrofurantoina (100,0%), cefalotina (78,9%), ceftriaxona e cefepime (73,6%); e em relação a *E. coli* 94,2% para ampicilina, e 75,0% sulfazotrim. A proporção de amostras com resistência a norfloxacin foi mais alta nas amostras da comunidade (86,9%), quando comparados aos de natureza hospitalar (31,5%).

Ainda na **tabela 15**, a análise da susceptibilidade aos antimicrobianos mostrou que a maioria das amostras tinham perfil multirresistente (96,1%), tanto em hospitalares quanto as comunitárias, com 93,1% e 98,6% respectivamente, sendo que todas as amostras de *K. pneumoniae* e 93,8% daquelas de *E. coli* apresentaram o fenótipo multirresistente.

**Tabela 15** - Perfis de resistência aos antimicrobianos de amostras de *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* resistentes às fluoroquinolonas  
(continua)

Antimicrobiano	Micro-organismos n=129 (%)					
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>			<i>Escherichia coli</i>		
	n= 48 (37,2%)			n= 81 (62,8%)		
	Hospitalar n= 29 (60,4%)	Comunitária n= 19 (39,6)	Total %	Hospitalar n= 29 (35,8)	Comunitária n= 52 (64,2)	Total %
Amicacina	02 (06,9%)	-	04,2	-	-	-
Ampicilina	29 (100,0%)	19 (100,0%)	100,0	25 (86,2%)	49 (94,2%)	91,3
Ampicilina/Sulbactam	18 (62,1%)	-	37,5	13 (44,8%)	02 (03,8%)	18,5
Cefepime	29 (100,0%)	14 (73,7%)	89,6	12 (41,4%)	15 (28,8%)	33,3
Cefoxitina	01 (03,4%)	-	02,1	05 (17,2%)	-	06,2
Cefalotina	11 (37,9%)	15 (78,9%)	54,2	10 (34,5%)	03 (05,8%)	16,0
Ceftriaxona	29 (100,0%)	14 (73,7%)	89,6	12 (41,4%)	15 (28,8%)	33,3
Ertapenem	02 (06,9%)	01 (05,3%)	06,2	01 (03,4%)	-	01,2
Gentamicina	22 (75,9%)	08 (42,1%)	62,5	06 (20,7%)	11 (21,1%)	21,0
Nitrofurantoina	10 (34,5%)	19 (100,0%)	60,4	03 (10,3%)	17 (32,7%)	24,7
Imipenem	01 (03,4%)	-	02,1	-	-	-
Meropenem	01 (03,4%)	01 (05,3%)	04,2	-	-	-
Piperacilina/Tazobactam	27 (93,1%)	10 (52,6%)	77,1	06 (20,7%)	06 (11,5%)	14,8

**Tabela 15** - Perfis de resistência aos antimicrobianos de amostras de *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* resistentes às fluoroquinolonas  
(conclusão)

Antimicrobiano	Micro-organismos n=129 (%)					
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> n= 48 (37,2%)			<i>Escherichia coli</i> n= 81 (62,8%)		
	Hospitalar	Comunitária	Total	Hospitalar	Comunitária	Total
	n= 29 (60,4%)	n= 19 (39,6%)	%	n= 29 (35,8)	n= 52 (64,2)	%
Sulfazotrim	09 (31,0%)	13 (68,4%)	45,8	07 (24,1%)	39 (75,0%)	56,8
Norfloxacino	11 (37,9%)	19 (100,0%)	62,5	12 (41,4%)	47 (90,4%)	72,8
Ciprofloxacina	29 (100,0%)	19 (100,0%)	100,0	29 (100,0%)	51 (98,1%)	98,8
<b>Fenótipo</b>						
Resistente	-	-	-	04 (13,79%)	01 (01,92%)	6,2
Multirresistente	29 (100,0%)	19 (100,0%)	100,0	25 (86,20%)	51 (98,07%)	93,8

- Frequência igual à zero.

Na **tabela 16** estão os resultados do CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub>, a presença de determinantes PMQR e Integron de Classe 1, bem como o perfil clonal das amostras clínicas resistentes às fluoroquinolonas incluídos no estudo (**Figura 5 e 6**).

De acordo com a análise molecular 5,0%, 45,0%, 15,0%, 15,0%, 5,2%, 31,6%, 15,9% amostras de *K. pneumoniae* de origem comunitária e hospitalar carregavam os genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrD*, *qnrS*, *aac(6')-Ib*, *aac(6')-Ib-cr* e *aac(6')-Ib<sub>7</sub>*, respectivamente, no qual os genes PMQR foram detectados em 13 amostras (13/19). Enquanto entre as de *E. coli* os genes *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr* e *aac(6')-Ib<sub>7</sub>*, estavam presentes em 15,0%, 5,0%, 26,3% e 5,3%, respectivamente, e os determinantes PMQR foram encontrados em 8 amostras de *E. coli* (**Tabela 16 e Tabela suplementar 2 – Apêndice C**). A coexistência de diferentes genes PMQR na mesma amostra clínica foi observada ao longo deste estudo em 35% das amostras de *K. pneumoniae* (7/20) e 5% daqueles de *E. coli* (1/20) (**Tabela suplementar 2 – Apêndice C**).

Além disso, a presença do gene *intI* foi observada em 85% das cepas de *K. pneumoniae* e 95,0% de *E. coli*. As concentrações mínimas para inibir 50,0% e 90,0% das 20 amostras de cada espécie foram 128 µg/mL e 512 µg/mL para *K. pneumoniae* e 512 µg/mL para *E. coli*, respectivamente (**Tabela 16**). Independentemente da presença de genes PMQR a CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> para ciprofloxacina foi elevada. Os resultados de similaridade genética obtidos por PFGE mostraram um perfil policlonal para as ambas as espécies, sendo encontrados treze perfis genotípicos distintos de *K. pneumoniae* (A-M) diferenciadas por um coeficiente de similaridade acima de 80,0%, e nove para *E. coli* (A-I), sendo que nenhum dos clones apresentou subtipos (**Figura 5 e 6**).



**Tabela 16** - Caracterização de 40 micro-organismos da família *Enterobacteriaceae* resistentes às fluoroquinolonas, em relação à concentração inibitória mínima, genes PMQR/*aac(6')-Ib*, *intI*, e pulsotipos do PFGE

(continua)

	Amostras	Origem	Espécime	Fenótipo	CIM <sup>2</sup>	PMQR <sup>3</sup>	Integron <sup>4</sup>	PFGE <sup>5</sup>
					(µg/mL) CIP <sup>6</sup>			
<i>K. pneumoniae</i>	39	Comunitária	Urina	MDR <sup>1</sup>	128	<i>aac(6')-Ib*</i>	<i>intI</i>	E
	57	Comunitária	Urina	MDR	128	- <sup>7</sup>	<i>intI</i>	ND <sup>8</sup>
	79	Comunitária	Urina	MDR	128	<i>qnrB</i>	-	A
	88	Comunitária	Urina	MDR	64	<i>aac(6')-Ib</i>	<i>intI</i>	C
	112	Comunitária	Urina	MDR	512	<i>qnrB, aac(6')-Ib-cr</i>	<i>intI</i>	H
	120	Comunitária	Urina	MDR	32	-	<i>intI</i>	ND
	129	Comunitária	Urina	MDR	256	<i>qnrA, aac(6')-Ib-cr</i>	<i>intI</i>	M
	150	Comunitária	Urina	MDR	16	-	<i>intI</i>	ND
	164	Comunitária	Urina	MDR	04	<i>qnrS</i>	<i>intI</i>	ND
	177	Comunitária	Urina	MDR	256	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>intI</i>	F
	4	Hospitalar	Sangue	MDR	256	<i>qnrB, aac(6')-Ib-cr</i>	<i>intI</i>	B
	33	Hospitalar	Secreção Traqueal	MDR	64	<i>qnrB</i>	<i>intI</i>	K
	55	Hospitalar	Secreção Abdominal	MDR	128	<i>qnrB, qnrD</i>	<i>intI</i>	J

**Tabela 16** - Caracterização de 40 micro-organismos da família *Enterobacteriaceae* resistentes às fluoroquinolonas, em relação à concentração inibitória mínima, genes PMQR/*aac(6')-Ib*, *intI*, e pulsotipos do PFGE

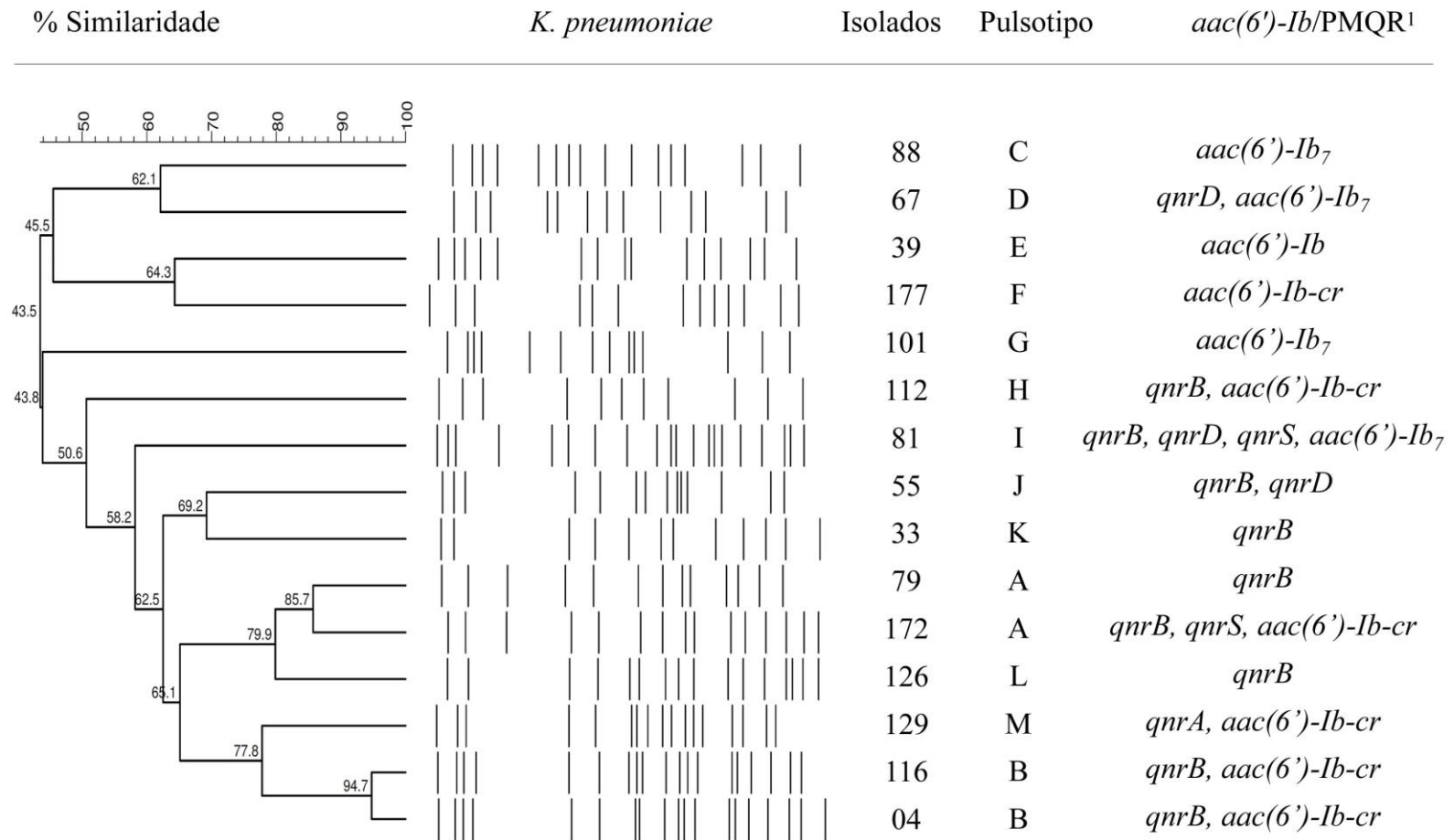
(continuação)

	Amostras	Origem	Espécime	Fenótipo	CIM <sup>2</sup> (µg/mL) CIP <sup>6</sup>	PMQR <sup>3</sup>	Integron <sup>4</sup>	PFGE <sup>5</sup>
<i>K. pneumoniae</i>	<b>67</b>	Hospitalar	Sangue	MDR	16	<i>qnrD, aac(6')-Ib<sub>7</sub></i>	-	D
	<b>81</b>	Hospitalar	Sangue	MDR	128	<i>qnrB, qnrD, qnrS, aac(6')-Ib<sub>7</sub></i>	<i>intI</i>	I
	<b>101</b>	Hospitalar	Sangue	MDR	08	<i>aac(6')-Ib<sub>7</sub></i>	-	G
	<b>116</b>	Hospitalar	Urina	MDR	512	<i>qnrB, aac(6')-Ib-cr</i>	<i>intI</i>	B
	<b>126</b>	Hospitalar	Urina	MDR	512	<i>qnrB</i>	<i>intI</i>	L
	<b>172</b>	Hospitalar	Sangue	MDR	512	<i>qnrB, qnrS, aac(6')-Ib-cr</i>	<i>intI</i>	A
	<b>174</b>	Hospitalar	Urina	MDR	512	-	<i>intI</i>	ND
<i>E. coli</i>	<b>14</b>	Comunitária	Urina	MDR	512	-	<i>intI</i>	ND
	<b>54</b>	Comunitária	Urina	MDR	04	-	<i>intI</i>	ND
	<b>59</b>	Comunitária	Urina	MDR	512	<i>qnrS</i>	<i>intI</i>	B
	<b>72</b>	Comunitária	Urina	MDR	512	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>intI</i>	E
	<b>77</b>	Comunitária	Urina	MDR	64	-	<i>intI</i>	ND
	<b>98</b>	Comunitária	Urina	MDR	128	<i>aac(6')-Ib<sub>7</sub></i>	<i>intI</i>	ND
	<b>102</b>	Comunitária	Urina	MDR	512	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>intI</i>	F

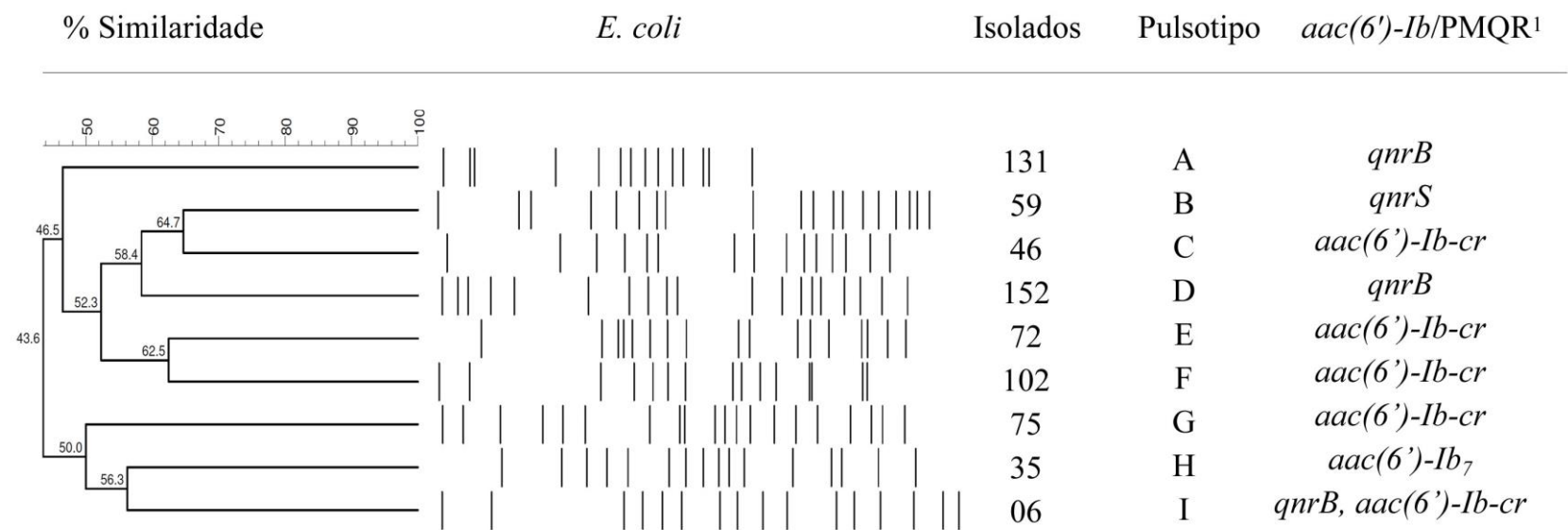
**Tabela 16** - Caracterização de 40 micro-organismos da família *Enterobacteriaceae* resistentes às fluoroquinolonas, em relação à concentração inibitória mínima, genes PMQR/*aac(6')-Ib*, *intI*, e pulsotipos do PFGE

Amostras	Origem	Espécime	Fenótipo	CIM <sup>2</sup> (µg/mL)	PMQR <sup>3</sup>	(conclusão)	
						Integron <sup>4</sup>	PFGE <sup>5</sup>
131	Comunitária	Urina	MDR	512	<i>qnrB</i>	<i>intI</i>	A
152	Comunitária	Urina	MDR	128	<i>qnrB</i>	<i>intI</i>	D
46	Hospitalar	Urina	MDR	128	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>intI</i>	C
6	Hospitalar	Urina	MDR	512	<i>qnrB</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>intI</i>	I
31	Hospitalar	Sangue	MDR	512	-	<i>intI</i>	ND
34	Hospitalar	Sangue	MDR	64	-	<i>intI</i>	ND
35	Hospitalar	Sangue	MDR	512	<i>aac(6')-Ib*</i>	<i>intI</i>	H
42	Hospitalar	Sangue	MDR	32	-	<i>intI</i>	ND
47	Hospitalar	Sangue	MDR	512	-	<i>intI</i>	ND
75	Hospitalar	Secreção Traqueal	MDR	64	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>intI</i>	G
89	Hospitalar	Sangue	MDR	512	-	<i>intI</i>	ND
100	Hospitalar	Sangue	MDR	512	-	<i>intI</i>	ND
119	Hospitalar	Sangue	MDR	512	-	-	ND

<sup>1</sup>Multirresistente; <sup>2</sup>Concentração inibitória mínima; <sup>3</sup>*Plasmid-mediated quinolone resistance* <sup>4</sup>Integron de Classe 1; <sup>5</sup>*Pulsed field gel electrophoresis*; <sup>6</sup>Ciprofloxacina; <sup>7</sup>Negativo; <sup>8</sup>Não determinado; \*Não foi possível fazer a leitura do sequenciamento.



**Figura 5** - Dendrograma dos perfis de *Pulsed-field Gel Electrophoresis* (PFGE), e de resistência das amostras de *Klebsiella pneumoniae*. Escala representa as porcentagens de similaridade. <sup>1</sup>Aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase type Ib e/ou Plasmid-mediated quinolone resistance.



**Figura 6** - Dendrograma dos perfis de *Pulsed-field Gel Electrophoresis* (PFGE), e de resistência das amostras de *Escherichia coli*. Escala representa as porcentagens de similaridade. <sup>1</sup>*Aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase type Ib* e/ou *Plasmid-mediated quinolone resistance*.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. Estudo epidemiológico-molecular de infecções por *P. aeruginosa* resistentes às fluoroquinolonas e/ou carbapenêmicos

Os nossos resultados evidenciaram a presença de genes responsáveis pela resistência aos carbapenêmicos, mediando a produção de metalo- $\beta$ -lactamases, principalmente do tipo SPM, assim como resistência a outras classes de antibióticos nas amostras clínicas de *P. aeruginosa*, características frequentes observadas nos hospitais do país. Adicionalmente relata-se pela primeira vez no Brasil a presença de genes plasmidiais responsáveis por resistência às fluoroquinolonas (PMQR) nesta espécie.

Investigações recentes evidenciam que a presença de determinantes de virulência somada a multirresistência aos antibióticos em *P. aeruginosa* são características que estão associadas a sua expressiva disseminação nos hospitais (BECEIRO; TOMÁS; BOU, 2013; KOUTSOGIANNOU et al., 2013; GALETTI et al., 2015).

Entre os fatores de risco independentes para o desenvolvimento de infecções por *P. aeruginosa* MDR destacam-se: uso prévio de antibióticos (carbapenêmicos e cefalosporinas de amplo espectro), pacientes restritos ao leito ou internados em unidades de terapia intensiva (UTI), hospitalização prolongada, infecção ou colonização prévia pelo micro-organismo *P. aeruginosa*, doença de base grave, ventilação mecânica, e história de doença pulmonar obstrutiva crônica (ALLOUSH et al., 2006; HIRSCH; TAM, 2010). Entretanto, os resultados obtidos nesta investigação apontam apenas a terapia antibiótica inadequada como fator de risco independentemente associado ao desenvolvimento de infecções por *P. aeruginosa* MDR. A literatura fornece evidências de que a emergência de amostras MDR pode resultar do tratamento inadequado, e pelo uso empírico de carbapenêmicos (VAN DER WERF et al., 2012; MOREIRA et al., 2013).

Entre os pacientes com bacteremia (158 pacientes), 44,3% foram por amostras resistentes aos carbapenêmicos, 42,4% resistente às fluoroquinolonas e 42,4% com um perfil multirresistente. A associação entre bacteremia e amostras resistentes aos antimicrobianos é frequente, mas poucos estudos têm abordado este problema de forma sistemática (GROß et al., 2011; DANTAS et al., 2014; SLIGL; DRAGAN; SMITH, 2015). Esta associação entre bacteremia e *P. aeruginosa* resistentes às fluoroquinolonas foi observada em nosso estudo com frequência elevada e independentemente associada com os pacientes internados por mais tempo (56,7%). O mesmo foi observado quando da avaliação do perfil MDR (58,2%). No

grupo de pacientes com infecções por *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos, foi observada maior frequência de mortalidade precoce (5 dias), estatisticamente significativa entre aqueles com hemocultura positiva, ao contrário do observado naqueles com PAV, em que o fator de risco importante foi a terapia inapropriada. Estes aspectos são frequentemente observados em países em desenvolvimento como o Brasil (CONTERNO; WEY; CASTELO, 2012; DANTAS et al., 2014; FERREIRA et al., 2015), onde fatores como: falta de laboratórios de microbiologia, recursos humanos e financeiros, dificuldades na implementação de práticas de controle e prevenção de infecções hospitalares, e utilização frequente e pouco criteriosa de antibióticos, aspectos que favorecem a emergência e transmissão intra e inter-hospitalar de patógenos resistentes (KNOBLER et al., 2003; GONTIJO-FILHO, 2006; PADOVEZE et al., 2015).

Atualmente, estima-se que 40% dos pacientes hospitalizados recebem tratamento com algum tipo de antimicrobiano e em, aproximadamente, 50% dos casos, este uso é desnecessário (WANNMACHER, 2004; MANDELL; VENNET; DOLIN, 2005). Além disso, a terapia empírica se faz com a combinação de vários antibióticos com espectro de ação abrangente, que ao exercer pressão seletiva, favorece a emergência e disseminação de bactérias resistentes (SHLAES, 1999). Recentemente, Dantas e colaboradores (2015) relataram que a densidade do uso de antibióticos é maior no HC-UFU quando comparada com a de hospitais em outros países, justificando-se o aparecimento de resistência entre os micro-organismos (HARBARTH et al., 2002; ONG et al., 2011), particularmente em UTIs. No nosso estudo, a maioria dos pacientes estava nessa unidade, seguindo-se unidades cirúrgicas e clínica médica.

Além da multirresistência, os dados observados mostraram que a resistência aos carbapenêmicos é muito alta, ratificando relatos do aumento significativo das frequências de resistência na América Latina, onde sua disseminação está relacionada a clones dominantes e a produção de enzimas do tipo MBL (ANDRADE et al., 2003; BAUMGART; MOLINARI; SILVEIRA, 2010; SCHEFFER et al., 2010b; AKYA et al., 2015). No Brasil, o gene predominante que codifica MBL é *bla<sub>SPM-1</sub>*, disseminado pelo clone SP/ST277 (GALES et al., 2003; WRIGHT et al., 2014; COSTA et al., 2015; FONSECA et al., 2015), detectado pela primeira vez em São Paulo, e que atualmente se espalhou por diferentes regiões geográficas do país devido ao seu potencial pandêmico, e está associado a frequências elevadas de morbidade e mortalidade (SILVA et al., 2014; COSTA et al., 2015; GALETTI et al., 2015; FONSECA et al., 2015). Em nosso estudo, foi observada frequência da enzima do tipo SPM, principalmente nas amostras do clone A, além de duas amostras com o gene *bla<sub>VIM</sub>*. A

frequência deste último tipo está aumentando nos hospitais brasileiros (SADER et al., 2005; FRANCO et al., 2010). A presença de um clone de *P. aeruginosa* multirresistente que persiste por longos períodos, semanas a meses no ambiente, com grande potencial de disseminar, aumenta o potencial de transmissão e disseminação de genes de resistência entre os pacientes hospitalizados, o que torna mandatória a utilização de estratégias de prevenção e controle de infecção, incluindo políticas para a melhor utilização de antimicrobianos, particularmente em UTIs de hospitais que oferecem assistência a nível terciário (FERREIRA, 2014).

Adicionalmente, a resistência às fluoroquinolonas também é um problema crescente em hospitais de países como o Brasil como foi previamente referido (MINARINI; DARINI, 2012; BOUCHILLON et al., 2012), e até o momento poucos estudos têm investigado a ocorrência de determinantes PMQR em *P. aeruginosa* (LIU et al., 2014; JIANG et al., 2014; YANG et al., 2015), ao contrário do relatado para os micro-organismos da família *Enterobacteriaceae*, nos quais são mais prevalentes (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011; YANG; NAM; LEE, 2014; SANA et al., 2014; SEYEDPOUR; EFTEKHAR, 2014; PIEKARSKA et al., 2015). No momento, os genes PMQR mais relevantes são *aac(6')-Ib-cr*, *qnr* e aqueles que codificam bombas de efluxo como *qepA* (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011). Os nossos resultados revelam a sua presença em amostras clínicas de *P. aeruginosa* (5,3%), bem como frequência elevada da variante *aac(6')-Ib<sub>7</sub>*. A frequência de PMQR observada foi maior do que as relatadas em outros trabalhos (JIANG et al., 2014; YANG et al., 2015). De acordo com o estudo conduzido por Jiang et al. (2014), a frequência de amostras clínicas carregando o gene *aac(6')-Ib-cr* foi de 1,9% (2/106 amostras), e a frequência total de determinantes PMQR foi de 3,8% em amostras de *P. aeruginosa*, enquanto no estudo de Yang e colaboradores (2015), apenas um em 256 amostras de *P. aeruginosa* (0,4%) apresentou esse gene. Esses resultados revelam particularidades quanto a epidemiologia geográfica e ratificam a existência de diferenças entre regiões e países. A coexistência de diferentes genes PMQR na mesma amostra clínica não foi observada, embora tenha sido relatada por outros pesquisadores (JIANG et al., 2014; LIU et al., 2014).

Outra observação interessante foi o diagnóstico de uma infecção mista de ferida por *E. coli* e *P. aeruginosa* no paciente cuja a segunda amostras foi positiva para o gene PMQR *aac(6')-Ib-cr*. A possibilidade da transferência de genes PMQR entre diferentes BGN é uma realidade em estudos *in vitro*, dando origem a transconjugantes (YANG; NAM; LEE, 2014), e a transferência horizontal *in vivo* é uma possibilidade real, como sugere o estudo de Mata e colaboradores (2010). Embora a amostra de *E. coli* desta infecção não tenha sido recuperado



para verificar a presença de genes PMQR, nossos dados mostraram que esses determinantes são comuns em amostras de *E. coli*.

Em relação à similaridade genética entre as amostras, nossos dados apontam uma prevalência de clones dominantes responsáveis pela disseminação da resistência aos carbapenêmicos e multirresistência, mas evidenciam que aqueles que apresentam genes PMQR apresentaram um modelo policlonal.

Segundo a literatura, a aquisição de alto nível de resistência às fluoroquinolonas frequentemente inclui a combinação de diversos mecanismos, tais como mutações nos genes que codificam a DNA girase e topoisomerase IV, bem como a presença de bombas de efluxo (OWENS; LAUTENBACH, 2008; ZURFLUH et al., 2014), mas fica claro que esses processos podem ser acelerados também pela presença de determinantes PMQR (ZURFLUH et al., 2014). Este estudo fornece evidência adicional para importância dos determinantes PMQR em amostras de *P. aeruginosa* multirresistentes. Além disso, as características de resistência, bem como, dos genes detectados e perfil clonal das amostras descritas neste estudo sugerem que a troca de material genético é frequente no ambiente hospitalar resultando numa evolução constante da microbiota dos pacientes com implicações na epidemiologia das infecções. Merece também ser enfatizada alta frequência de terapia inadequada em pacientes com infecções graves, fator complicador em relação ao prognóstico do paciente, aumentando o desafio no tocante ao controle de micro-organismos multirresistentes.

## **5.2. Estudo epidemiológico-molecular de infecções por *K. pneumoniae* e *E. coli* resistentes às fluoroquinolonas**

Além da presença de determinantes PMQR na maioria das amostras analisadas nesta investigação (55,3%), com CIM elevada para ciprofloxacina (512 µg/mL), tanto para os de *E. coli* quanto de *K. pneumoniae*, observou-se predomínio de infecções comunitárias (55,0%; 71/129) e do trato urinário (72,9%; 94/129).

Atualmente, o Brasil apresenta frequências mais elevadas de resistência às fluoroquinolonas entre os países da América Latina (BIEDENBACH et al., 2006; MINARINI; DARINI, 2012). De acordo com os dados do SENTRY *Antimicrobial Surveillance Program*, no período de 2008 a 2010, corresponderam a 44,4% em *K. pneumoniae* e 27,3% para *E. coli* em relação a ciprofloxacina (GALES et al., 2012). Como mencionado anteriormente, diferentes mecanismos estão relacionados ao desenvolvimento dessa resistência, destacando-se aqueles associados a mutações cromossômicas nos genes que

codificam a DNA girase e topoisomerase IV (HOOPER; WOLFSON, 1993; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011; ALDRED; KERNS; OSHEROFF, 2014). Recentemente, ocorreu um aumento exponencial da resistência resultante da sua mediação por plasmídeos (PMQR, do inglês *Plasmid mediated quinolone resistance*), que potencializa sua disseminação nas amostras de origem hospitalar (PARK et al., 2006; ROBICSEK et al., 2006a; ROBICSEK; JACOBY; HOOPER, 2006b; KIM et al., 2009; STRAHILEVITZ et al., 2009; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011). Contudo menos enfoque é dado àquelas amostras de origem comunitária (SEYEDPOUR; EFTEKHAR, 2014).

Os nossos dados evidenciam que tanto entre amostras de *K. pneumoniae* quanto de *E. coli* a presença de genes PMQR foi alta (55,3%), inclusive entre amostras de origem comunitária, mas com predomínio naqueles de origens hospitalar e comunitária, respectivamente. Yang, Nam e Lee (2014) também relataram alta frequência (79,4%), entre amostras de *K. pneumoniae* (100%) e de *E. coli* (73,8%). Entre os genes PMQR identificados no nosso trabalho, o alelo *qnrB* foi o mais frequente (30%; 12/40), seguido pela variante *aac(6')-Ib-cr* (28,9%; 11/38), o gene *qnrS* (10,0%; 4/40), *qnrD* (7,5%; 3/40), e *qnrA* (2,5%; 1/40). A literatura refere que os genes *qnrS*, *qnrB* e *aac(6')-Ib-cr* são os determinantes PMQR mais comuns nestes micro-organismos (MARTINEZ-MARTINEZ et al., 2008; SEYEDPOUR; EFTEKHAR, 2014).

Além da alta frequência desses determinantes, 90% das amostras apresentaram uma CIM de 512 µg/mL para ciprofloxacina. No total, os níveis de resistência para *E. coli* foram mais elevados do que para *K. pneumoniae*, e a maioria das amostras correspondeu a pacientes com infecções comunitárias e do trato urinário, dados diferentes quando comparados aos de outros estudos (PAIVA et al., 2012; YANG; NAM; LEE, 2014; SANA et al., 2014; PIEKARSKA et al., 2015). Estes altos níveis são sugestivos da coexistência de outros mecanismos de resistência nestas amostras, principalmente mutações em genes de DNA girase e topoisomerase IV (PAIVA et al., 2012; ROCHA et al., 2014), que não foram avaliados neste estudo.

Adicionalmente, entre as amostras com a presença de genes PMQR, observou-se alta frequência de multirresistência. Essa associação é uma realidade na etiologia de infecções hospitalares (KIM et al., 2009; XIA; REN; XU, 2013; CAO et al., 2014), e a presença do fenótipo multirresistente em pacientes com infecções comunitárias também tem sido relatada (IBRAHIM; BILAL; HAMID, 2012; ANSARI et al., 2015; MAMANI, et al., 2015), o que pode estar relacionada particularmente à pacientes ambulatoriais (MAMANI, et al., 2015), portanto, infecções relacionadas à assistência a saúde (IRAS) (SILVA et al., 2015). Os nossos

resultados são semelhantes a outros relatados de países em desenvolvimento ao que se refere às infecções por micro-organismos multirresistentes adquiridas na comunidade (ANSARI et al., 2015; YAHIAOUI et al., 2015; MAMANI et al., 2015), apontando frequências elevadas de *E. coli* resistentes, particularmente aos  $\beta$ -lactâmicos bem como fluoroquinolonas, e multirresistentes (BARAL et al., 2012; KHANAL et al., 2013; ANSARI et al., 2015; MAMANI et al., 2015). Entretanto, a resistência às fluoroquinolonas varia geograficamente, representando um problema tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento (BOYD et al., 2008; ANSARI et al., 2015).

Os nossos dados mostraram predominância de infecções urinárias de natureza comunitária (72,3%; 68/94) causadas principalmente por *E. coli* (73,5%, 50/68), em pacientes do sexo feminino (52,0%), que são usualmente de natureza endógena (INDRANI, 2004), sugestivo da participação da comunidade na emergência dessa resistência, que resulta de uma multiplicidade de fatores, destacando-se práticas em medicina humana e veterinária, pressão ambiental antrópica, e sobretudo o uso inapropriado de antibióticos, principalmente por tempo prolongado e em baixas doses (CHENIA; PILLAY; PILLAY, 2006; MATHUR; SINGH, 2013; ANSARI et al., 2015; YAHIAOUI et al., 2015). A disseminação de patógenos resistentes e MDR no ambiente hospitalar depende fundamentalmente de inexistência ou não adesão à protocolos de controle de infecções, tais como: higiene das mãos, triagem dos pacientes infectados, precauções de barreira, limpeza ambiental e uso judicioso de antibióticos (MATHUR; SINGH, 2013).

A disseminação de genes de resistência é amplamente associada a elementos genéticos denominados integrons, que são capazes de capturar e expressar genes exógenos, possibilitando a rápida emergência de bactérias resistentes e multirresistentes aos antibióticos (WHITE; MCIVER; RAWLINSON, 2001; GILLINGS, 2014). Nossos dados mostraram que integrons de classe 1 foi frequente entre as amostras (85% para *K. pneumoniae* e 95% para *E. coli*), independente da sua origem. Há possibilidade que estes determinantes PMQR estejam inseridos no cassete como parte deste integron, entretanto, mais pesquisas são necessárias, uma vez que a literatura mostra claramente que alguns genes PMQR, principalmente *qnrA*, *qnrB* e *aac(6')-Ib-cr*, já foram encontrados neste elemento genético (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011; JACOBY et al., 2014).

No presente estudo, observou-se grande diversidade clonal entre as amostras de *E. coli*, ao contrário do observado para *K. pneumoniae* em que houve dominância de dois clones (A e B), refletindo quando da investigação uma situação endêmica do HC-UFU, contudo, não houve um clone prevalente associado aos determinantes PMQR. Esses achados corroboram o

descrito por Piekarska et al. (2015) no que refere ao perfil policlonal, em que a maioria das amostras exibiram padrões individuais e não foram relacionados, sugestivos que os determinantes PMQR são adquiridos principalmente por transferência horizontal e não por disseminação clonal.

É interessante analisar com mais detalhe dois *clusters* observados no decorrer da investigação. No primeiro, um dos pacientes apresentou o mesmo clone de *K. pneumoniae* em amostras de origens comunitária e hospitalar (clone A). Inicialmente, o paciente com infecção de origem comunitária foi atendido na unidade de emergência do hospital com diagnóstico de constipação intestinal (10/07/2014), e com relato de infecção urinária (12/07/2014), na qual verificou-se a presença de gene *qnrB*. Ele foi internado novamente (07/08/2014) após alta, em uma das unidades de cirurgia. A seguir, após aproximadamente um mês, outro paciente, com diagnóstico de câncer, foi internado na mesma unidade (17/09/2014), e diagnosticado com sepse de natureza hospitalar, com amostra de *K. pneumoniae* apresentando os genes *intI*, *qnrB*, *qnrS* e *aac(6')-Ib-cr*. O estudo de discriminação genética revelou que os micro-organismos recuperados pertenciam ao clone A e possuíam o mesmo fenótipo (MDR).

No segundo *cluster* dois pacientes foram infectados por amostras pertencentes ao clone B, ambos de origem hospitalar com a presença dos mesmos genes (*qnrB*, *aac(6')-Ib-cr* e *intI*) e pertencentes ao fenótipo MDR. O primeiro caso (sepse) foi detectado na UTI (19/04/2014) em um paciente com traumatismo craniano, que permaneceu hospitalizado durante 25 dias, enquanto o segundo paciente foi internado na unidade cirúrgica (31/07/2014) e evoluiu com infecção urinária, sem, portanto relação temporal e espacial entre eles, que justificassem transmissão cruzada.

Devido a similaridade clonal observada nos *clusters*, sugere-se a possibilidade da aquisição de outros genes associados a resistência às fluoroquinolonas por transferência horizontal, internação nas mesmas unidades bem como da possibilidade da participação de outros pacientes colonizados/infectados não incluídos no estudo. Além disso, deve-se considerar a potencial participação do ambiente na transmissão de *K. pneumoniae* e *E. coli*, considerando que as superfícies podem ser contaminadas por esses micro-organismos e que estes possuem habilidade de sobreviver nestes ambientes durante meses (WILLIAMS et al., 2005; KRAMER; SCHWEBKE; KAMPF, 2006).

A persistência de um clone multirresistente por longos períodos no ambiente em diferentes unidades do hospital pode justificar esta disseminação entre os pacientes hospitalizados, evidenciando a necessidade de aprimorar as estratégias de prevenção e controle de infecção, destacando-se a limpeza do ambiente e rigor na adesão à higienização

das mãos por profissionais de saúde, além da inclusão de utilização de antimicrobianos e adoção de precauções com pacientes infectados e/ou colonizados por micro-organismos multirresistentes. O modelo epidemiológico da presença tanto de clones dominantes como da ausência de uma similaridade clonal apontam para a possibilidade de haver simultaneamente uma persistência ambiental do micro-organismo bem como a influência de um uso intenso e inapropriado de antimicrobianos no hospital.

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

## 6. CONCLUSÕES

Os nossos resultados:

- Ratificam a resistência por metalo- $\beta$ -lactamases através do gene *bla<sub>SPM</sub>* e a relação em um genótipo em *P. aeruginosa* c, e apontam a terapia antimicrobiana inapropriada como preditor para a emergência de amostras multirresistentes, além de estar relacionada ao pior prognóstico em pacientes com infecções graves por *P. aeruginosa*.
- Mostram que uma alta frequência de pacientes com infecções por *K. pneumoniae* e *E. coli* receberam terapia antimicrobiana inapropriada, inclusive aqueles pacientes que evoluíram para óbito.
- Evidenciam pela primeira vez no Brasil, a presença de determinantes PMQR em *P. aeruginosa*, bem como alta frequência da variante *aac(6')-Ib<sub>7</sub>*.
- Revelam alta prevalência de genes PMQR entre *K. pneumoniae* e *E. coli* independente da origem, se hospitalar ou comunitária, bem como do fenótipo multirresistente.
- Mostram que não houve relação entre a elevação da CIM para ciprofloxacina e a presença de genes PMQR.
- Apontam uma alta frequência do integron do tipo 1 entre as amostras de *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e *E. coli*, contudo sua associação com o cassete gênico não foi investigada.
- Evidenciam grande diversidade clonal entre as amostras de *E. coli* e *K. pneumoniae*.

## 7. REFERÊNCIAS

- AKYA, A.; SALIMI, A.; NOMANPOUR, B.; AHMADI, K. Prevalence and Clonal Dissemination of Metallo-Beta-Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* in Kermanshah. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 8, p. e20980, 2015.
- ALDRED, K.J.; KERNS, R.J.; OSHEROFF, N. Mechanism of Quinolone Action and Resistance. **Biochemistry**, v. 53, p. 1565–1574, 2014.
- ALEKSHUN, M.N.; LEVY, S.B. Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. **Cell**, v. 128, p. 1037-1050, 2007.
- ALLEGIANZI, B.; NEJAD, S.B.; COMBESCURE, C.; GRAAFMANS, W.; ATTAR, H.; DONALDSON, L.; PITTET, D. Burden of endemic health-care-associated infection in developing countries: systematic review and meta-analysis. **Lancet**, v. 377, p. 228–41, 2011.
- ALLEN, H. K.; DONATO, J.; WANG, H. H.; CLOUD-HANSEN, K. A.; DAVIES, J.; HANDELSMAN, J. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 251-259, 2010.
- 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, p. 43–48, 2006.
- ALP, E.; VOSS, A. Ventilator associated pneumonia and infection control. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 5, n. 7, p. 1-11, 2006.
- ANDRADE, L.N.; WOODFORD, N.; DARINI, A.L.C. International gatherings and potential for global dissemination of São Paulo metallo- $\beta$ -lactamase (SPM) from Brazil. **Letters to the Editor/International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 43, p. 195– 200, 2014.
- ANDRADE, S.S.; JONES, R.N.; GALES, A.C.; SADER, H.S. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Latin American medical centres: 5 year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–2001). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, p. 140–141, 2003.
- ANSARI, S.; NEPAL, H.P.; GAUTAM, R.; SHRESTHA, S.; NEOPANE, P.; GURUNG, G.; CHAPAGAIN, M.L. Community acquired multi-drug resistant clinical isolates of *Escherichia coli* in a tertiary care center of Nepal. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 4, n. 15, 2015.

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

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

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Assistência Segura: Uma Reflexão Teórica Aplicada à Prática**. 1 Ed, Série Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde. Brasília, 2013c.

BARAL, P.; NEUPANE, S.; MARASINI, B.P.; GHIMIRE, K.R.; LEKHAK, B.; SHRESTHA, B. High prevalence of multidrug resistance in bacterial uropathogens from Kathmandu, Nepal. **BMC Research Notes**, v. 5, n. 38, 2012.

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

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.

BECEIRO, A.; TOMÁS, M.; BOU, G. Antimicrobial Resistance and Virulence: a Successful or Deleterious Association in the Bacterial World?. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, p. 185–230, 2013.

BENNETT, P.M. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bactéria. **British Journal of Pharmacology**, v. 153, p. S347–S357, 2008.

BIEDENBACH, D.J.; TOLEMAN, M.; WALSH, T.R.; JONES, R.N. Analysis of *Salmonella* spp. with resistance to extended-spectrum cephalosporins and fluoroquinolones isolated in North America and Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997 - 2004). **Diagnostic Microbiology and Infection Disease**, v. 54, n. 1, p. 13-21, 2006.

BOUCHILLON, S.; HOBAN, D.J.; BADAL, R.; HAWSER, S. Fluoroquinolone Resistance Among Gram-Negative Urinary Tract Pathogens: Global Smart Program Results, 2009-2010. **The Open Microbiology Journal**, v. 6, p. 74-78, 2012.



BOYD, L.B.; ATMAR, R.L.; RANDALL, G.L.; HAMILL, R.J.; STEFFEN, D.; ZECHIEDRICH, L. Increased fluoroquinolone resistance with time in *Escherichia coli* from >17,000 patients at a large county hospital as a function of culture site, age, sex, and location. **BMC Infectious Diseases**, v. 8, n. 4, 2008.

BREIDENSTEIN, E.B.M.; DE LA FUENTE-NÚÑEZ, C.; HANCOCK, R.E.W. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. **Trends in Microbiology**, v. 19, p. 419–426, 2011.

BRUNING, L.M. Emerging infectious diseases: threats to the OR? **Today's Surg Nurse**, v. 18, p. 21–23, 1996.

BURGOS, J.; LUJÁN, M.; LARROSA, M.N.; PEDRO-BOTET, M.L.; FONTANALS, D.; QUESADA, M.D.; LUNG, M.; BERMUDO, G.; ALMIRANTE, B.; FALCÓ, V. The problem of early mortality in pneumococcal pneumonia: a study of risk factors. **The European Respiratory Journal**, v. 46, n. 2, 2015.

CAO, X.; XU, X.; ZHANG, Z.; SHEN, H.; CHEN, J.; ZHANG, K. Molecular characterization of clinical multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 13, n. 16, 2014.

CAPUANO, V.S.C. **Estudo comparativo de métodos fenotípicos e biomoleculares para determinação de resistência a antibióticos em cepas de *Salmonella* spp isoladas de coiro e carcaça de bovinos e produtos cárneos**. 2012. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Antibiotic Resistance and the Threat to Public Health**. House Committee on Energy and Commerce, Subcommittee on Health. P. 1-16, 2010.

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

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

CHANG, C.; LU, P.; LIN, C.; LEE, T.; TSAI, M.; CHANG, L. Integron types, gene cassettes, antimicrobial resistance genes and plasmids of *Shigella sonnei* isolates from outbreaks and sporadic cases in Taiwan. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, p. 197–204, 2011.

CHENIA, H.Y.; PILLAY, B.; PILLAY, D. Analysis of the mechanisms of fluoroquinolone resistance in urinary tract pathogens. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, p. 1274–8, 2006.

CHOWDHURY, P.R.; STOKES, H.W.; LABBATE, M. Integrons: antibiotic resistance evolution and beyond. In: ROBERTS, A.P.; MULLANY, P. **Bacterial Integrative Mobile Genetic Elements**. Austin: Landes Biosciences, p. 53–69, 2011.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. Document M100-S24, 2014.

CONTERNO, L.O.; WEY, S.B.; CASTELO, A. *Staphylococcus aureus* Bacteremia: Comparison of Two Periods and a Predictive Model of Mortality. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 6, p. 288-297, 2002.

COSTA, L.M.A.; FLEMING, M.E.C.K.; PAULA, G.R.; TEIXEIRA, L.A.; MONDINO, P.J.J.; MONDINO, S.S.B.; MENDONÇA-SOUZA, C.R.V. Production of metallo- $\beta$ -lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated in the State of Sergipe, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, p. 212-215, 2015.

DANTAS, R.C. **Estudo epidemiológico molecular da resistência aos carbapenêmicos em *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de sangue: produção de  $\beta$ -lactamases, perda de porina OprD e hiperexpressão de bombas de efluxo**. 2015. 107f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015.

DANTAS, R.C.; FERREIRA, M.L.; GONTIJO-FILHO, P.P.; RIBAS, R.M. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: independent risk factors for mortality and impact of resistance on outcome. **Journal of Medical Microbiology**, v. 63, 2014.

DAOUD, Z.; AFIF, C. *Escherichia coli* Isolated from Urinary Tract Infections of Lebanese Patients between 2000 and 2009: Epidemiology and Profiles of Resistance. **Chemotherapy Research and Practice**, v. 2, n. 26, 2011.

DAOUD, Z.; SOKHN, E.S.; MASRI, K.; MATAR, G.M.; DORON, S. *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections of Lebanese patients between 2005 and 2012: epidemiology and profiles of resistance. **Frontiers in Medicine**, v. 2, n. 26, 2015.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 3, p. 417-433, 2010.

DEPARDIEU, F.; PODGLAJEN, I.; LECLERCQ, R.; COLLATZ, E.; COURVALIN, P. Modes and Modulations of Antibiotic Resistance Gene Expression. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 1, p. 79–114, 2007.

ECDC, European Centre for Disease Prevention and Control. **Point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals 2011–2012**. Stockholm, 2013.

EISENSTEIN, B.I.; ZALEZNIK, D.F. Enterobacteriaceae. In: MANDELL, G.L.; BENNETT, J.E.; DOLIN, R. **Principles and practice of infectious diseases**. 5 ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, p. 2294–2310, 2000.

ELLINGTON, M.J.; WOODFORD, N. Fluoroquinolone resistance and plasmid addiction systems: self-imposed selection pressure?. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, p. 1026–1029, 2006.

FERGUSON, J. Antibiotic prescribing: how can emergence of antibiotic resistance be delayed?. **Aust Prescr.**, v. 27, n. 2, 2004.

FERREIRA, M.L.; DANTAS, R.C.; FARIA, A.L.S.; GONÇALVES, I.R.; BRITO, C.S.; QUEIROZ, L.L.; GONTIJO-FILHO, P.P.; RIBAS, R.M. Molecular epidemiological survey of the quinolone- and carbapenem-resistant genotype and its association with the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, p. 262–271, 2015.

FERREIRA, M.L. **Estudo Epidemiológico Molecular da Resistência a Carbapenêmicos e Fluoroquinolonas e sua Associação com Sistema de Secreção Tipo III em *Pseudomonas aeruginosa***. 2014. 89f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014.

FLUIT, A.C.; SCHMITZ, F.J. Resistance integrons and super-integrons. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, p. 272–288, 2004.

FONSECA, E.L.; MARIN, M.A.; ENCINAS, F.; VICENTE, A.C.P. Full characterization of the integrative and conjugative element carrying the metallo- $\beta$ -lactamase *bla*<sub>SPM-1</sub> and bicyclomycin *bcr1* resistance genes found in the pandemic *Pseudomonas aeruginosa* clone SP/ST277. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 9, p. 2547-2550, 2015.

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, p. 825–829, 2010.

GALES, A.C.; CASTANHEIRA, M.; JONES, R.N.; SADER, H.S. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008–2010). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, p. 354–360, 2012.

GALES, A.C.; JONES, R. N.; SADER, H.S. Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006–09). **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, p. 2070–2074, 2011.

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

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

GALETTI, R.; ANDRADE, L.N.; CLÍMACO, E.C.; PITONDO-SILVA, A.; FERREIRA, J.C.; DARINI, A.L.C. Genomic diversification and virulence features in SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* 13 years later. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 82, p. 179–180, 2015.

GAYNES, R. The impact of antimicrobial use on the emergence of antimicrobial-resistant bacteria in hospitals. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 11, n. 4, p. 757–65, 1997.

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

GILLINGS, M.R. Integrins: Past, Present, and Future. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 78, n. 2, p. 257–277, 2014.

GONTIJO-FILHO, P.P. Problemas da vigilância epidemiológica de infecções hospitalares sem o uso de critérios microbiológicos no Brasil. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 27, p. 97-102, 2006.

GROß, U.; AMUZU, S.K.; CIMAN, R.; KASSIMOVA, I.; GROß, L.; RABSCH, W.; ROSENBERG, U.; SCHULZE, M.; STICH, A.; ZIMMERMANN, O. Bacteremia and Antimicrobial Drug Resistance over Time, Ghana. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, p. 1879-1882, 2011.

GULEN, T.A.; GUNER, R.; CELIKBILEK, N.; KESKE, S.; TASYARAN, M. Clinical importance and cost of bacteremia caused by nosocomial multi drug resistant *Acinetobacter baumannii*. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 38, p. 32–35, 2015.

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

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

HOOPER, D.C.; WOLFSON, J.S. Mechanism of quinolone action and bacterial killing. In: HOOPER, D.C.; WOLFSON, J.S. **Quinolone antimicrobial agents**. 2 ed. Washington: American Society for Microbiology, p. 53–75, 1993.

HU, Y.; CAI, J.; ZHANG, R.; ZHOU, H.; SUN, Q.; CHEN, G. Emergence of *Proteus mirabilis* Harboring *bla*<sub>KPC-2</sub> and *qnrD* in a Chinese Hospital. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, p. 2278–2282, 2012.

HUDDLESTON, J.R. Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: potential spread of antibiotic resistance genes. **Infection and Drug Resistance**, v. 7, p. 167–176, 2014.

IBRAHIM, M.E.; BILAL, N.E.; HAMID, M.E. Increased multi-drug resistant *Escherichia coli* from hospitals in Khartoum state, Sudan. **African Health Sciences**, v. 12, n. 3, p. 368-375, 2012.

INDRANI, T.K. **Domiciliary Care in Midwifery**. 1 ed. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers Ltd, 2004.

JACOBY, G.A.; STRAHILEVITZ, J.; HOOPER, D.C. Plasmid-mediated quinolone resistance. **Microbiology Spectrum**, v. 2, n. 2, 2014.

JIANG, X.; YU, T.; JIANG, X.; ZHANG, W.; ZHANG, L.; MA, J. Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in Henan, China. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 79, p. 381-383, 2014.

JONES, R.N. Global Epidemiology of Antimicrobial Resistance Among Community Acquired and Nosocomial Pathogens: A Five Year Summary From the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 24, n. 1, 2003.

KAPIL, A. The challenge of antibiotic resistance: Need to contemplate. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 121, p. 83-91, 2005.

KARLOWSKY, J.A.; JONES, M.E.; THORNSBERRY, C.; CRITCHLEY, I.; KELLY, L.J.; SAHM, D.F. Prevalence of anti microbial resistance among urinary tract pathogens isolated from female outpatients across the US in 1999. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 18, p. 121-127, 2001.

KHANAL, S.; JOSHI, D.R.; BHATTA, D.R.; DEVKOTA, U.; POKHREL, B.M. Production of multidrug resistant bacterial pathogens from tracheal aspirates of intensive care unit patients at National Institute of Neurological and Allied Sciences, Nepal. **ISRN Microbiology**, v. 2, p. 847569, 2013.

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.

KIM, H. B.; PARK, C. H.; KIM, C. J.; KIM, E. C.; JACOBY, J. A.; HOOPER, D. C. Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants over a 9-Year Period. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 2, p. 639-645, 2009.

KNOBLER, S.L.; LEMON, S.M.; NAJAFI, M.; BURROUGHS, T. **The Resistance Phenomenon in Microbes and Infectious Disease Vectors. Implications for Human Health and Strategies for Containment**. Washington: National Academies Press, 2003.

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

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

KOUTSOGIANNOU, M.; DROUGKA, E.; LIAKOPOULOS, A.; JELASTOPULU, E.; PETINAKI, E.; ANASTASSIOU, E.D.; SPILIOPOULOU, I.; CHRISTOFIDOU, M. Spread of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Clones in a University Hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, p. 665–668, 2013.

KRAMER, A.; SCHWEBKE, I.; KAMPF, G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. **BMC Infectious Diseases**, v. 6, p. 130, 2006.

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.

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

LIU, Y.; DENG, Q.; YU, Y.; CAO, X.; XU, Q.; WAN, L. Analysis of the resistance mechanism and homology of carbapenems-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Zhonghua Shao Shang Za Zhi**, v. 30, p. 15-20, 2014.

LIVERMORE, D.M. Minimising antibiotic resistance. **Lancet Infectious Disease**, v. 5, p. 450–59, 2005.

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

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

MAGUIRE, A.J.; BROWN, D.F.J.; GRAY, J.J.; DESSELBERGER, U. Rapid Screening Technique for Class 1 Integrons in Enterobacteriaceae and Nonfermenting Gram-Negative Bacteria and Its Use in Molecular Epidemiology. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 4, n. 4, p. 1022–1029, 2001.

MAMANI, M.; NOBARI, N.; ALIKHANI, M.Y.; POOROLAJAL, J. Antibacterial susceptibility of *Escherichia coli* among outpatients with community-acquired urinary tract infection in Hamadan, Iran. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 3, p. 40–43, 2015.

MANDAL, J.; ACHARYA, N.S.; BUDDHAPRIYA, D.; PARIJA, S.C. ANTIBIOTIC resistance pattern among common bacterial uropathogens with a special reference to ciprofloxacin resistant *Escherichia coli*. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 136, n. 5, p. 842–849, 2012.

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

MARTINEZ-MARTINEZ, L.; ELIECER CANO, M.; MANUEL RODRIGUEZ-MARTINEZ, J.; CALVO, J.; PASCUAL, A. Plasmid-mediated quinolone resistance. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 6, n. 5, p. 685–711, 2008.

MATA, C.; MIRO, E.; MIRELIS, B.; GARCILLAN-BARCIA, M.P.; DE LA CRUZ, F.; COLL, P.; NAVARRO, F. In vivo transmission of a plasmid coharbouring *bla*<sub>DHA-1</sub> and *qnrB* genes between *Escherichia coli* and *Serratia marcescens*. **FEMS Microbiology Letter**, v. 308, p. 24–28, 2010.

MATHUR, P.; SINGH, S. Multidrug Resistance in Bacteria: A Serious Patient Safety Challenge for India. **Journal of Laboratory Physicians**, v. 5, n. 1, p. 5-10, 2013.

MATTNER, F.; BANGE, F.; MEYER, E.; SEIFERT, H.; WICHELHAUS, T.A.; CHABERNY, I.F. Preventing the Spread of Multidrug-Resistant Gram-Negative Pathogens. **Deutsches Ärzteblatt International**, v. 109, n. 3, p. 39–45, 2012.

MAZEL, D. Integrons: agents of bacterial evolution. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 8, p. 608-620, 2006.



MCCLARAN, J.; BERGLAS, R.T.; FRANCO, E.D. Long hospital stays and need for alternate level of care at discharge Does family make a difference for elderly patients? **Canadian Family Physician**, v. 42, p. 449-461, 1996.

MELLO, M.J.G.; ALBUQUERQUE, M.F.P.M.; LACERDA, H.R.; SOUZA, W.V.; CORREIA, J.B.; BRITTO, M.C.A. Risk factors for healthcare-associated infection in pediatric intensive care units: a systematic review. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25, n. 3, p. S373-S391, 2009.

MEMISH, Z.A.; SHIBL, A.M.; KAMBAL, A.M.; OHALY, Y.A.; ISHAQ, A.; LIVERMORE, D.M. Antimicrobial resistance among non-fermenting Gram-negative bacteria in Saudi Arabia. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, p. 1701-1705, 2012.

MENDES, C.; OPLUSTIL, C.; SAKAGAMI, E.; TURNER, P.; KIFFER, C. Antimicrobial susceptibility in intensive care units: MYSTIC Program Brazil 2002. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p. 44-51, 2005.

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

MEYER, E.; JONAS, D.; SCHWAB, F.; RUEDEN, H.; GASTMEIER, P.; DASCHENER, F.K. Design of a Surveillance System of Antibiotic Use and Bacterial Resistance in German Intensive Care Units (SARI). **Infection**, v. 31, 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.R.; DARINI, A.L.C. Mutations in the quinolone resistance-determining regions of *gyrA* and *parC* in *Enterobacteriaceae* isolates from Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 4, 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.

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, p. 39-44, 2013.

MURTHY, R. Implementation of Strategies to Control Antimicrobial Resistance. **CHEST**, v. 119, p. 405S–411S, 2001.

NISS, National Nosocomial Infections Surveillance System Report, Data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004, **American Journal of Infection Control**, v. 32, b. 8, p. 470-485, 2004.

ODUMOSU, B.T.; ADENIYI, B.A.; CHANDRA, R. Analysis of integrons and associated gene cassettes in clinical isolates of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* from Southwest Nigeria. **Annals of clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 12, n. 29, 2013.

OLIVEIRA, A.C.; CLEMENTE, W.T.; LUCAS, T.C.; MARTINHO, G.H. Infecções hospitalares e resistência microbiana em Unidade de Cuidados Intensivos de um Hospital Universitário. **Online Brazilian Journal of Nursing**, v. 5, n. 2, 2006.

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.

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

OLIVEIRA, A.C.; SILVA, R.S.; DÍAZ, M.E.P.; IQUIAPAIZA, R.A. Resistência bacteriana e mortalidade em um centro de terapia intensiva. **Rev. Latino-Am.**, v. 18, n. 6, 2010.

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

OWENS, R.C.; LAUTENBACH, E. Antimicrobial resistance problem pathogens and Clinical Countermeasures. **The New England Journal of Medicine**, p. 550-551, 2008.

PADOVEZE, M.C.; FORTALEZA, C.M.C.B. Healthcare associated infections: challenges to public health in Brazil. **Revista de Saude Publica**, v. 48, n. 6, p. 995–1001, 2014.

PADOVEZE, M.C.; FORTALEZA, C.M.C.B.; KIFFER, C.; BARTH, A.L.; CARNEIRO, I.C.R.S.; GIAMBERARDINO, H.I.G.; RODRIGUES, J.L.N.; FILHO, L.S.; MELLO, M.J.G.; PEREIRA, M.S.; GONTIJO-FILHO, P.P.; ROCHA, M.; MEDEIROS, E.A.S.; PIGNATARI, A.C.C. Structure for prevention of health care–associated infections in Brazilian hospitals: A countrywide study. **American Journal of Infection Control**, p. 1-6, 2015.

PAIVA, M.C.; NASCIMENTO, A.M.; CAMARGO, I.L.; LIMA-BITTENCOURT, C.I.; NARDI, R.M. The first report of the *qnrB19*, *qnrS1* and *aac(6')-Ib-cr* genes in urinary isolates of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, p. 687–689, 2012.

PARK, C.H.; ROBICSEK, A.; JACOBY, J.A.; SAHM, D.; HOOPER, D.C. Prevalence in the United States of *aac(6)-Ib-cr* Encoding a Ciprofloxacin-Modifying Enzyme. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, p. 3953–3955, 2006.

PATRICK, D.M.; MARRA, F.; HUTCHINSON, J.; MONNET, D.L.; NG, H.; BOWI, W.R. Per Capita Antibiotic Consumption: How Does a North American Jurisdiction Compare with Europe? **Per Capita Antibiotic Consumption**, v. 39, p. 11-17, 2004.

PELEG, A.Y.; HOOPER, D.C. Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria. **The new england journal of medicine**, v. 362, 2010.

PIEKARSKA, K.; WOŁKOWICZ, T.; ZACHARCZUK, K.; RZECZKOWSKA, M.; CHROST, A.; BAREJA, E.; OLAK, M.; GIERCZYNSKI, R. Co-existence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants and mutations in *gyrA* and *parC* among fluoroquinolone-resistant clinical *Enterobacteriaceae* isolated in a tertiary hospital in Warsaw, Poland. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 45, p. 238-243, 2015.

PODSCHUN, R.; ULLMANN, U. *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 4, p. 589–603, 1998.

POIREL, L.; CATTOIR, V.; NORDMANN, P. Plasmid-mediated quinolone resistance; interactions between human, animal, and environmental ecologies. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. 24, p. 1-7, 2012.

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.

POLLINI, S.; MARADEI, S.; PECILE, P.; et al. FIM-1, a new acquired metallo- $\beta$ -lactamase from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Italy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 410–416, 2013.

PORTO, J.P.; MANTESE, O.C.; ARANTES, A.; FREITAS, C.; GONTIJO FILHO, P.P.; RIBAS, R.M. Nosocomial infections in a pediatric intensive care unit of a developing country: NHSN surveillance. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 4, p. 475-479, 2012.

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, p. 713-8, 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, p.1633-1641, 2006.

RICE, L.B.; SAHM, D.; BINOMO, R.A. Mechanisms of resistance to antibacterial agents. In: PATRICK, R.M.; BARON, E.J.; AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, et al. **Manual of clinical microbiology**. 8 ed. Washington: ASM Press, p. 1074-101, 2003.

ROBICSEK, A.; STRAHILEVITZ, J.; SAHM, D. F.; JACOBY, G. A.; HOOPER, D. C. *qnr* Prevalence in Ceftazidime-Resistant *Enterobacteriaceae* Isolates from the United States. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 8, p. 2872–2874, 2006a.

ROBICSEK, A.; JACOBY, G. A.; HOOPER, D. C. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. **Lancet Infectious Disease**, v. 6, p. 629-640, 2006b.

ROCHA, L.K.L.; NETO, L.R.S.; GUIMARÃES, A.C.C.; ALMEIDA, A.C.S.; VILELA, M.A.; MORAIS, M.M.C. Plasmid-mediated *qnrA1* in *Klebsiella pneumoniae* ST147 in Recife, Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, p. e1–e2, 2014.

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

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, J.M.; CANO, M.E.; VELASCO, C.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; PASCUAL, Á. Plasmid mediated quinolone resistance: an update. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 17, p. 149–82, 2011.

ROSSI, F. The Challenges of Antimicrobial Resistance in Brazil. **Antimicrobial Resistance**, v. 52, 2011.

ROWE-MAGNUS, D.A.; MAZEL, D. Integrons: natural tools for bacterial genome evolution. **Current Opinion in Microbiology**, v. 4, n. 5, p. 565-569, 2001.

RUIZ, J.; PONS, M.J.; GOMES, C. Transferable mechanisms of quinolone resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 40, p. 196– 203, 2012.

SABAT, A.J.; BUDIMIR, A.; NASHEV, D.; SÁ-LEÃO, R.; VAN DIJL, J.M.; LAURENT, F.; GRUNDMANN, H.; FRIEDRICH, A.W.; ON BEHALF OF THE ESCMID STUDY GROUP OF EPIDEMIOLOGICAL MARKERS (ESGEM). Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. **Euro Surveillance**, v. 18, n. 4, p. 1-15, 2013.

SADER, H.S.; FARRELL, D.J.; FLAMM, R.K.; JONES, R.N. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms isolated from patients hospitalized in intensive care units in United States and European hospitals (2009–2011). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 78, p. 443–448, 2014.

SADER, H.S.; JONES, R.N.; GALES, A.C.; SILVA, J.B.; PIGNATARI, A.C.; SENTRY. SENTRY Antimicrobial Surveillance Program Report: Latin American and Brazilian Results for 1997 through 2001. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.8, n. 1, p. 25-79, 2004.

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

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.

SANA, F.; MABROUKA, S.; CLAUDINE, Q.; FAOUZI, S.A.; ILHEM, B.B.B.; VÉRONIQUE, D. Prevalence and characterization of uropathogenic *Escherichia coli* harboring plasmid-mediated quinolone resistance in a Tunisian university hospital. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 79, p. 247–251, 2014.

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, 2010a.

SCHEFFER, M.C.; GALES, A.C.; BARTH, A.L.; FILHO, J.R.C.; DALLA-COSTA, L.M. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* – clonal spread in Southern Brazil and in the State of Goiás. **The Brazilian Journal of Infectious Disease**, v. 14, p. 508-509, 2010b.

SCHWARZ, S.; SILLEY, P.; SIMJEE, S.; WOODFORD, N.; DUIJKEREN, E.V.; JOHNSON, A.P.; GAASTRA, W. Editorial: Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, 2010.

SEKIGUCHI, 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.

SEYEDPOUR, S.M.; EFTEKHAR, F. Quinolone Susceptibility and Detection of qnr and aac(6')-Ib-cr Genes in Community Isolates of *Klebsiella pneumoniae*. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 7, n. 7, p. e11136, 2014.

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

SHLAES, D.M.; GERDING, D.N.; JOHN, J.F.; CRAIG, W.A.; BORNSTEIN, D.L.; DUNCAN, R.A.; ECKMAN, M.R.; FARRER, W.E.; GREENE, W.H.; LORIAN, V.; LEVY, S.; MCGOWAN, J.E.; PAUL, S.M.; RUSKIN, J.; TENOVER, F.C.; WATANAKUNAKORN, C. Society for Healthcare Epidemiology of America and Infectious Diseases Society of America Joint Committee on the Prevention of Antimicrobial Resistance: Guidelines for the Prevention of Antimicrobial Resistance in Hospitals. **Clinical Infectious Diseases**, v. 25, p. 584-99, 1997.

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.

SILVA, A.R.A.; CAMPOS, A.L.M.; GIRALDES, J.M.; ALMEIDA, M.M.; OKA, C.M. Simulation Training for Prevention of Healthcare Associated-Infections. **Revista Brasileira De Educação Médica**, v. 39, n. 1, p. 5-11, 2015.

SILVA, L.V.; GALDINO, A.C.; NUNES, A.P.; DOS SANTOS, K.R.; MOREIRA, B.M.; CACCI, L.C.; et al. Virulence attributes in Brazilian clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 30, p. 990–1000, 2014.

SILVA, N.; OLIVEIRA, M.; BANDEIRA, A.C.; BRITES, C. Risk Factors for Infection by Extended-Spectrum Beta-Lactamase Producing *Klebsiella pneumoniae* in a Tertiary Hospital in Salvador, Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 10, n. 3, p. 191-193, 2006.

SLIGL, W.I.; DRAGAN, T.; SMITH, S.W. Nosocomial gram-negative bacteremia in intensive care: epidemiology, antimicrobial susceptibilities and outcomes. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 37, p. 129-134, 2015.

SOSA, A.J.; BYARUGABA, D.K.; AMÁBILE-CUEVAS, C.F.; HSUEH, P.; KARIUKI, S.; OKEKE, I.N. **Antimicrobial Resistance in Developing Countries**. Springer Science Business Media, 2010.

STRAHILEVITZ, J.; JACOBY, G. A.; HOOPER, D. C.; ROBICSEK, A. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance: a Multifaceted Threat. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 4, p. 664-689, 2009.

SUMMERS, A.O. Genetic linkage and horizontal gene transfer, the roots of the antibiotic multi-resistance problem. **Animal Biotechnology**, v. 17, p. 125–135, 2006.

TENOVER, F.C. The best of times, the worst of Times. The global challenge of antimicrobial resistance. **Pharmacy World & Science**, v. 17, n. 5, p. 149-51, 1995.

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.

TRAN, J.H.; JACOBY, G.A. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, p. 5638–42, 2002.

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

VAN DER WERF, M.J.; LANGENDAM, M.W.; HUITRIC, E.; MANISSERO, D. Multidrug resistance after inappropriate tuberculosis treatment: a meta-analysis. **European Respiratory Journal**, v. 39, p. 1511–1519, 2012.

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

WAWRZYNIAK, K.; MIKUCKA, A.; DEPULA, A.; GOSPODAREK, E.; KUSZA, K. Occurrence of alert pathogens in the clinical materials and consumption of antibiotics in the ICU, in the years 2007 and 2008. **Critical Care**, v. 14, n. 1, p. 53, 2010.

WHITE, P.A.; MCIVER, C.J.; RAWLINSON, W.D. Integrons and Gene Cassettes in the *Enterobacteriaceae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 9, p. 2658-2661, 2001.

WHITE, R.L.; FRIEDRICH, L.V.; MIHM, L.B.; BOSSO, J.A. Assessment of the Relationship between Antimicrobial Usage and Susceptibility: Differences between the Hospital and Specific Patient-Care Areas. **Clinical Infectious Diseases**, v. 31, p. 16–23, 2000.

WILLIAMS, A.P.; AVERY, L.M.; KILLHAM, K.; JONES, D.L. Persistence of *Escherichia coli* O157 on farm surfaces under different environmental conditions. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 1075-1083, 2005.

WOODFORD, N. Rapid Characterization of  $\beta$ -lactamases by Multiplex PCR. In: GILLESPIE, S. H.; MCHUGH, T. D. **Antibiotic Resistance Protocols**. 2 ed. Methods in Molecular Biology, v. 642, p. 181-192, 2010.

WOODFORD, N.; TURTON, J.F.; LIVERMORE, D.M. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 35, p. 736–755, 2011.

WRIGHT, L.L.; TURTON, J.F.; LIVERMORE, D.M.; HOPKINS, K.L.; WOODFORD, N. Dominance of international “high-risk clones” among metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the UK. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, p. 103–110, 2014.

WU, K.; WANG, F.; SUN, J.; WANG, Q.; CHEN, Q.; YU, S.; RUI, Y. Class 1 integron gene cassettes in multidrug-resistant Gram-negative bacteria in southern China. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 40, p. 264-267, 2012.



XIA, R.; REN, Y.; XU, H. Identification of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance qnr Genes in Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria from Hospital Wastewaters and Receiving Waters in the Jinan Area, China. **Microbial Drug Resistance**, v. 19, n. 6, 2013.

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.

YAHIAOUI, M.; ROBIN, F.; BAKOUR, R.; HAMIDI, M.; BONNET, R.; MESSAI, Y. Antibiotic Resistance, Virulence, and Genetic Background of Community-Acquired Uropathogenic *Escherichia coli* from Algeria. **Microbial Drug Resistance**, v. 21, n. 5, 2015.

YAMANE, K.; WACHINO, J.; SUZUKI, S.; KIMURA, K.; SHIBATA, N.; KATO, H.; SHIBAYAMA, K.; KONDA, T.; ARAKAWA, Y. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 51, n. 9, p. 3354–3360, 2007.

YANG, H.Y.; NAM, Y.S.; LEE, H.J. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance genes among ciprofloxacin-nonsusceptible *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from blood cultures in Korea. **The Canadian Journal of Infectious Disease & Medical Microbiology**, v. 25, n. 3, p. 163-169, 2014.

YANG, X.; XING, B.; LIANG, C.; YE, Z.; ZHANG, Y. Prevalence and fluoroquinolone resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital of South China. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 8, p. 1386-1390, 2015.

YONG, D.; BELL, J.; RITCHIE, B.; PRATT, R.; TOLEMAN, M.A.; WALSH, T.R. A novel sub group metallo- $\beta$ -lactamase (MBL), AIM-1 emerges in *Pseudomonas aeruginosa* (PSA) from Australia. **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. 5046-54, 2009.

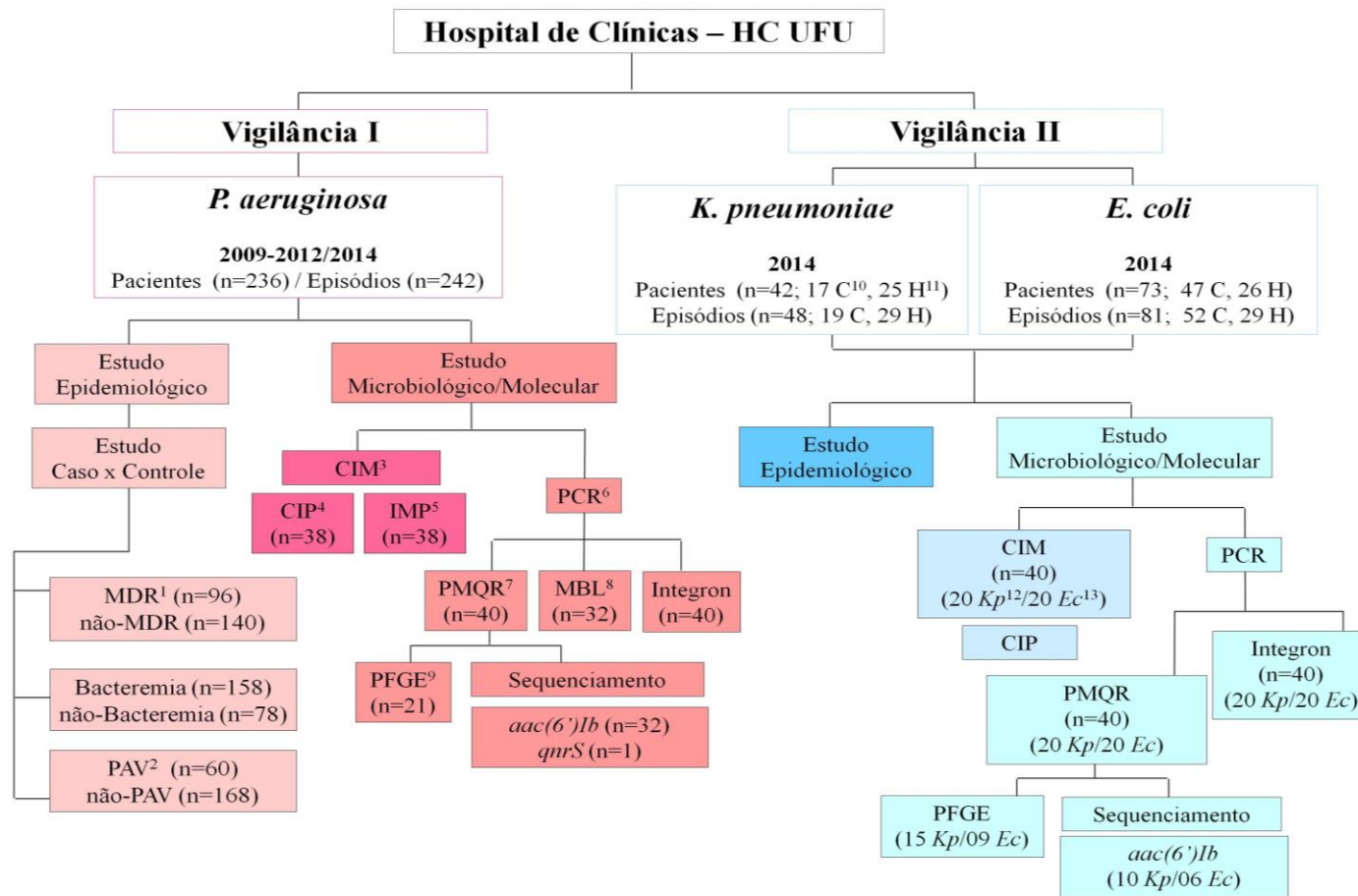
ZAIDI, A.K.; HUSKINS, W.C.; THAYER, D.; BHUTTA, Z.A.; ABBAS, Z.; GOLDMANN, D.A. Hospital-acquired neonatal infections in developing countries. **Lancet**, v. 365, p. 1175–88, 2005

ZAVASCKI, A.P.; CARVALHAES, C.G.; PICÃO, R.C.; GALES, A.C. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 8, n. 1, p. 71-93, 2010.

ZHAO, W.; HU, Z. Acquired metallo- $\beta$ -lactamases and their genetic association with class 1 integrons and ISCR elements in Gram-negative bacteria. **Future Microbiology**, v. 10, n. 5, p. 873–887, 2015.

ZURFLUH, K.; HÄCHLER, H.; NÜESCH-INDERBINEN, M.; STEPHAN, R. Quinolone Resistance Mechanisms among Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) Producing *Escherichia coli* Isolated from Rivers and Lakes in Switzerland. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e95864, 2014.

## APÊNDICE A



**Figura Suplementar 1** - Organograma da população estudada. <sup>1</sup>Multirresistente; <sup>2</sup>Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica; <sup>3</sup>Concentração inibitória mínima; <sup>4</sup>Ciprofloxacina; <sup>5</sup>Imipenem; <sup>6</sup>Reação em Cadeia da Polimerase; <sup>7</sup>Plasmid-mediated quinolone resistance; <sup>8</sup>Metalo-β-lactamase; <sup>9</sup>Pulsed field gel electrophoresis; <sup>10</sup>Infeções comunitárias; <sup>11</sup>Infeções hospitalares; <sup>12</sup>*K. pneumoniae*; <sup>13</sup>*E. coli*.

## APÊNDICE B

**Tabela Suplementar 1** - Características de 40 amostras de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes às fluoroquinolonas

<i>P. aeruginosa</i> (n/total)	CIM <sup>1</sup> (µg/mL) n= 38				MBL <sup>4</sup> (n/total)	PMQR/ <i>aac</i> (6')- <i>Ib</i> <sup>5</sup> (n/total)	Integron Classe 1 (n/total)	PFGE <sup>6</sup> %	Clone predominante
	IMP <sup>2</sup>		CIP <sup>3</sup>						
	50	90	50	90					
MDR (35/40)	>32	>32	16	64	SPM (05/32)	<i>qnrS</i> (01/40)	<i>intI</i> (36/40)	A: 14,3	A, B e C
não-MDR (05/40)					VIM (02/32)	<i>aac</i> (6')- <i>Ib-cr</i> (01/38)		B: 9,5	
						<i>aac</i> (6')- <i>Ib</i> <sub>7</sub> (28/38)		C: 9,5	
						<i>aac</i> (6')- <i>Ib</i> (03/38)		E- Q <sup>7</sup> : 4,8	

<sup>1</sup>Concentração inibitória mínima; <sup>2</sup>Imipenem; <sup>3</sup>Ciprofloxacina; <sup>4</sup>Metalo-β-lactamase; <sup>5</sup>*Plasmid-mediated quinolone resistance* e/ou *aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase type Ib*; <sup>6</sup>*Pulsed field gel electrophoresis*; <sup>7</sup>D-Q: 4,8% cada clone. Do total de amostras, 5 tiveram origem comunitária e 35 hospitalar.

## APÊNDICE C

**Tabela Suplementar 2** - Características de 20 amostras de *Klebsiella pneumoniae* e de 20 amostras de *Escherichia coli* resistentes às fluoroquinolonas

Micro-organismos (n/total)	Origem (n/total)	PMQR/ <i>aac</i> (6')- <i>Ib</i> <sup>1</sup> (n/total)	Integron de Classe 1 (n/total)	CIM <sup>2</sup> (µg/mL) CIP <sup>3</sup>		PFGE <sup>4</sup> %	Clone predominante
				50	90		
<i>K. pneumoniae</i> (20/40)	Hospitalar (10/20)	<i>qnrB</i> (07/10)	<i>intI</i> (08/10)	128	512	A: 13,3 B: 13,3 C-M <sup>5</sup> : 6,7	A e B
		<i>qnrD</i> (03/10)					
		<i>qnrS</i> (02/10)					
		<i>aac</i> (6')- <i>Ib-cr</i> (03/09)					
		<i>aac</i> (6')- <i>Ib</i> <sub>7</sub> (03/09)					
	Comunitária (10/20)	<i>qnrA</i> (01/10)	<i>intI</i> (09/10)	512	512	A-I: 11,1	-
		<i>qnrB</i> (02/10)					
		<i>qnrS</i> (01/10)					
		<i>aac</i> (6')- <i>Ib</i> (01/09)					
		<i>aac</i> (6')- <i>Ib-cr</i> (03/09)					
<i>E. coli</i> (20/40)	Hospitalar (11/20)	<i>qnrB</i> (01/11)	<i>intI</i> (09/10)	512	512	A-I: 11,1	-
		<i>aac</i> (6')- <i>Ib-cr</i> (02/10)					
	Comunitária (09/20)	<i>qnrB</i> (02/09)	<i>intI</i> (10/10)	512	512	A-I: 11,1	-
		<i>qnrS</i> (01/09)					
		<i>aac</i> (6')- <i>Ib-cr</i> (03/08)					
		<i>aac</i> (6')- <i>Ib</i> <sub>7</sub> (01/08)					

<sup>1</sup>Plasmid-mediated quinolone resistance ou aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase type Ib; <sup>2</sup>Concentração inibitória mínima; <sup>3</sup>Ciprofloxacina;

<sup>4</sup>Pulsed-field Gel Electrophoresis; <sup>5</sup>6,7% cada clone.

## ANEXO A

**FICHA INDIVIDUAL DE VIGILÂNCIA**

Mês: \_\_\_\_\_

Placa \_\_\_\_\_ Paciente \_\_\_\_\_ Pedido \_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Nome \_\_\_\_\_ Idade \_\_\_\_\_ Gênero \_\_\_\_\_

Diagnóstico Entrada \_\_\_\_\_ Data de admissão \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Clínica \_\_\_\_\_

Transferência \_\_\_\_\_

UTI: ( ) S ( ) N \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_. Cirurgia prévia: ( ) S ( ) N. \_\_\_\_\_

Co-morbidades: ( ) Cardiopatia, ( ) Nefropatia, ( ) Neoplasia, ( ) Diabetes, ( ) Vascular. Outros: \_\_\_\_\_

Procedimentos invasivos: ( ) CVC, ( ) VM, ( ) SV, ( ) TRAQ, ( ) SNG/E, ( ) DRENO, ( ) NP, ( ) HEMOD. \_\_\_\_\_

Sítio amostras \_\_\_\_\_ ESBL ( ) sim; ( ) não.

Micro-organismo \_\_\_\_\_ Outros \_\_\_\_\_

Antibiograma															
AMIC	AMP	AMP/S	CEFE	CEFO	CEFA	CEFT	CIPRO	ERT	GENT	NITR	NOR	IMIP	MER	PI/T	SULF

Data infecção: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Uso prévio de ATB ( ) sim; ( ) não.

ATB	Início	Fim	ATB	Início	Fim

Evolução: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ ( ) Alta ( ) Óbito. Origem bacteriana \_\_\_\_\_







Tratamento inadequado ( ) sim; ( ) não. Causa \_\_\_\_\_

Tempo de hospitalização \_\_\_\_\_ Tempo prévio \_\_\_\_\_

Dias até alta/óbito \_\_\_\_\_

Obs.: \_\_\_\_\_

## ANEXO B

DETALHAR PROJETO DE PESQUISA																	
<b>DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA</b>																	
<p> <b>Título da Pesquisa:</b> Disseminação de resistência às quinolonas mediada por plasmídeo em amostras clínicas de <i>Klebsiella pneumoniae</i>, <i>Escherichia coli</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em Hospital Universitário Mineiro  <b>Pesquisador Responsável:</b> Paulo Pinto Gontijo Filho  <b>Área Temática:</b>  <b>Versão:</b> 2  <b>CAAE:</b> 36601814.7.0000.5152  <b>Submetido em:</b> 15/12/2014  <b>Instituição Proponente:</b> Instituto de Ciências Biomédicas  <b>Situação da Versão do Projeto:</b> Aprovado  <b>Localização atual da Versão do Projeto:</b> Pesquisador Responsável  <b>Patrocinador Principal:</b> Financiamento Próprio         </p> <div style="text-align: right;">  </div> <div style="text-align: right; margin-top: 10px;">           Comprovante de Recepção:  PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_393435         </div>																	
<b>DOCUMENTOS DO PROJETO DE PESQUISA</b>																	
<div>       Versão Atual Aprovada (PO) - Versão 2       <ul style="list-style-type: none"> <li>Projeto Original (PO) - Versão 2           <ul style="list-style-type: none"> <li>Curriculo dos Assistentes</li> <li>Documentos do Projeto               <ul style="list-style-type: none"> <li>Folha de Rosto - Submissão 1</li> <li>Informações Básicas do Projeto - Subm</li> <li>Interface REBEC - Submissão 1</li> <li>Outros - Submissão 1</li> <li>Projeto Detalhado / Brochura Investigad</li> <li>TCLE / Termos de Assentimento / Justi</li> </ul> </li> <li>Apreciação 1 - Universidade Federal de Ub</li> </ul> </li> <li>Projeto Completo</li> </ul> </div>		<table border="1"> <thead> <tr> <th>Tipo de Documento</th> <th>Situação</th> <th>Arquivo</th> <th>Postagem</th> <th>Ações</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td colspan="5" style="height: 100px;"></td> </tr> </tbody> </table>						Tipo de Documento	Situação	Arquivo	Postagem	Ações					
Tipo de Documento	Situação	Arquivo	Postagem	Ações													
<b>LISTA DE APRECIÇÕES DO PROJETO</b>																	
Apreciação <sup>+</sup>	Pesquisador Responsável <sup>+</sup>	Versão <sup>+</sup>	Submissão <sup>+</sup>	Modificação <sup>+</sup>	Situação <sup>+</sup>	Exclusiva do Centro Coord. <sup>+</sup>	Ações										
PO	Paulo Pinto Gontijo Filho	2	15/12/2014	30/03/2015	Aprovado	Não	   										
<b>HISTÓRICO DE TRÂMITES</b>																	
Apreciação	Data/Hora	Tipo Trâmite	Versão	Perfil	Origem	Destino	Informações										
PO	30/03/2015 11:55:06	Parecer liberado			Universidade Federal de Uberlândia/MG												
PO	30/03/2015 11:54:18	Parecer do Colegiado Editado			Universidade Federal de Uberlândia/MG	Universidade Federal de Uberlândia/MG											
PO	27/03/2015 19:26:13	Parecer do colegiado emitido			Universidade Federal de Uberlândia/MG	Universidade Federal de Uberlândia/MG											
PO	09/03/2015 17:09:08	Parecer do Colegiado Recusado			Universidade Federal de Uberlândia/MG	Universidade Federal de Uberlândia/MG	-										
PO	09/03/2015 13:30:11	Parecer do colegiado emitido			Universidade Federal de Uberlândia/MG	Universidade Federal de Uberlândia/MG											
PO	27/02/2015 16:10:17	Parecer do relator emitido			Universidade Federal de Uberlândia/MG	Universidade Federal de Uberlândia/MG											
PO	27/02/2015 15:46:20	Aceitação de Elaboração de Relatoria			Universidade Federal de Uberlândia/MG	Universidade Federal de Uberlândia/MG											
PO	19/12/2014 02:38:12	Confirmação de Indicação de Relatoria			Universidade Federal de Uberlândia/MG	Universidade Federal de Uberlândia/MG											
PO	16/12/2014 12:03:28	Indicação de Relatoria			Universidade Federal de Uberlândia/MG	Universidade Federal de Uberlândia/MG											
PO	16/12/2014 11:59:21	Aceitação do PP			Universidade Federal de Uberlândia/MG	Universidade Federal de Uberlândia/MG											
«« « Ocorrência 1 a 10 de 20 registro(s) » » »»																	