

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

JANE EIRE URZÊDO

***Pseudomonas aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos em um hospital
universitário de referência: impacto clínico, resistência e virulência**

Uberlândia

2020

JANE EIRE URZÊDO

***Pseudomonas aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos em um hospital
universitário de referência: impacto clínico, resistência e virulência**

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde, pelo Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia.

Orientador:

Prof. Dra. Rosineide Marques Ribas

Uberlândia

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

C972 2020	<p>Cunha, Jane Eire Urzedo, 1971- Pseudomonas aeruginosa resistente aos carbapenêmicos em um hospital universitário de referência: impacto clínico, resistência e virulência. [recurso eletrônico] / Jane Eire Urzedo Cunha. - 2020.</p> <p>Orientador: Rosineide Marques Ribas. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Ciências da Saúde. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.te.2020.807 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Ciências médicas. I. Ribas, Rosineide Marques, 1974- , (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Ciências da Saúde. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 61</p>
--------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091

FICHA DE APROVAÇÃO

15/12/2020

SEI/UFU - 2442863 - Ata de Defesa - Pós-Graduação



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Av. Pará, 1720, Bloco 2H, Sala 09 - Bairro Umarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: 34 3225-8628 - www.ppcsa.famed.ufu.br - copme@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Ciências da Saúde				
Defesa de:	Tese de Doutorado Nº 012/PPCSA				
Data:	09.12.2020	Hora de início:	09:00h	Hora de encerramento:	12:30h
Matrícula do Discente:	11713CSD009				
Nome do Discente:	Jane Eire Urzedo Cunha				
Título do Trabalho:	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente aos carbapenêmicos em um hospital universitário de referência: impacto clínico, resistência e virulência.				
Área de concentração:	Ciências da Saúde				
Linha de pesquisa:	3: Fisiopatologia das doenças e dos agravos à saúde				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Microbiologia molecular aplicada e pesquisa relacionada a interação patógeno-hospedeiro				

Reuniu-se em web conferência pela plataforma Mconf-RNP, em conformidade com a PORTARIA Nº 36, DE 19 DE MARÇO DE 2020 da COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR - CAPES, pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, assim composta: Lílian Alves Rocha (Lacen-DF), Michel Rodrigues Moreira (UFJF), Helisângela de Almeida Silva (UFU), Ralciane de Paula Menezes (UFU) e Rosineide Marques Ribas (UFU) orientadora da candidata.

Iniciando os trabalhos a presidente da mesa, Dra. Rosineide Marques Ribas, apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu a Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovada.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Rosineide Marques Ribas, Professor(a) do Magistério Superior**, em 09/12/2020, às 12:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ralciane de Paula Menezes, Técnico(a) de Laboratório**, em 09/12/2020, às 12:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Helisangela de Almeida Silva, Professor(a) do Magistério Superior**, em 09/12/2020, às 12:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lilian Alves Rocha, Usuário Externo**, em 09/12/2020, às 12:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Michel Rodrigues Moreira, Usuário Externo**, em 09/12/2020, às 12:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2442863** e o código CRC **09184904**.

Dedico este trabalho primeiramente a Deus por permitir que eu tivesse saúde e determinação para não desanimar e ultrapassar todos os obstáculos encontrados ao longo desta trajetória.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela realização deste trabalho, por permanecer todos os dias comigo refazendo minhas forças, porque sua palavra diz: *Mas os que esperam no Senhor renovam suas forças, criam asas como as águias, correm sem se cansar, caminham sem parar (Is 40,31)*;

Ao meu pai, pela motivação e ensinamentos valiosos na nossa vida. Pelo cuidado e amor com seu neto Davi, obrigada por tudo;

De forma muito carinhosa, a confiança de minha mãe a mim depositada no período de construção deste trabalho. Que sempre dizia que tudo daria certo, era só confiar em Deus. Pelo carinho e cuidado com meu filho durante todo esse tempo, serei eternamente agradecida;

Ao meu esposo, companheiro e amigo, Ronaldo, por todo amor, incentivo, apoio e compreensão;

Ao meu filho, Davi, nosso presente de Deus, que iluminou meus pensamentos com sua alegria e sinceridade, principalmente quando recebia seu abraço nos momentos difíceis do trabalho, mamãe te ama muito!

À minha avó Maria (*in memoriam*), muito obrigada pelos ensinamentos valiosos e muito amor para com toda nossa família.

Aos meus irmãos, Janaína e Ciro distante ou próximo, mas sempre no meu coração; agradeço pela amizade, carinho e companheirismo de sempre; por estarem sempre torcendo pelas minhas conquistas. Pelo apoio e incentivo incondicional. Obrigada!! Amo muito vocês!!!

A minha afilhada, Jennifer pelo carinho e partilha, te amo muito !!! a minha sobrinha Maria Júlia pelo carinho!

A todos os meus familiares, sou grata pelo apoio incondicional que sempre me deram durante toda a minha vida;

A minha madrinha Tia Lourdes pela sua presença na forma de oração e amor;

As minhas queridas amigas (Rosa, Jaqueline, Francis e Ângela) que sempre estiveram ao meu lado, pela amizade incondicional e pelo apoio demonstrado ao longo de todo o período de tempo em que me dediquei a este trabalho;

A todos os queridos amigos do Laboratório de Análises Clínicas do HC-UFU (Gracinha, Rosinha, Ricardo, Tomaz e Ana Lúcia) sempre presentes em minha vida, tenho enorme carinho por vocês. Obrigada pela dedicação e disponibilidade por me ajudarem a concluir este trabalho!

As minhas queridas estagiárias e agora colegas de profissão (Jéssica Almeida, Jéssica Gomes, Maísa, Marcela, Marianne, Giseli) que de forma direta ou indireta contribuíram para o êxito do trabalho. Obrigada pela amizade e carinho!

À querida Ralciane de Paula Menezes, meu muito obrigada pela força nos momentos que queria desistir, pelas palavras de incentivo e carinho e também apoio e ajuda para que o trabalho fosse concluído. Meu muito obrigada!

Às colegas de laboratório de Microbiologia Molecular (Micromol): Melina pelo apoio com as análises estatísticas dos artigos, carinho e dedicação, te agradeço imensamente! Iara, meu muito obrigada também pelas contribuições e comprometimento na realização do trabalho! Daiane pelo carinho de sempre, obrigada!

Às minha amigas Maria Inêz e Sueli pelo carinho e incentivo por mais uma conquista vivenciada por vocês! Meu muito obrigada!

À minha orientadora, Prof. Dr^a Rosineide Marques Ribas, por ter acreditado em mim ao longo de todos esses anos de trabalho, mesmo diante de todos os percalços no caminho. Trabalhos que se iniciaram ainda na graduação. Sem a sua orientação, apoio e amizade não somente neste trabalho, mas em todo o caminho percorrido até aqui, nada seria possível. Obrigada por tudo!!

Ao Prof. Dr. Paulo P. Gontijo Filho, pela sua dedicação e valiosas contribuições nos trabalhos;

À querida Cristiane, técnica do Laboratório de Microbiologia Molecular (UFU), pelo carinho, escuta nos momentos difíceis e dedicação, sem a sua ajuda não teria êxito no trabalho. Muito obrigada!!

A todos os colegas do Serviço de Controle de Infecção Hospitalar (SCIH), em especial a Farmacêutica Simone pelo incentivo, muito obrigada!

À Comissão de Cuidados Paliativos que me acolheu com tanto carinho no momento que mais precisava: Dr. Marcelo, Fernanda, Rosângela e Valdirene, muito obrigada por tudo! Dra. Aglai, muito obrigada!

A todos os profissionais de saúde do Hospital Clínicas por toda a ajuda prestada;

Às secretárias do Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, Gisele e Viviane, pelas orientações prestadas;

Aos professores que aceitaram participar das bancas de qualificação e defesa de Doutorado: Prof. Dr^a. Raquel Dantas, Prof. Dr^a. Helisângela, Prof.^a Dr^a Lílilan Rocha, Prof. Dr. Michel Moreira, Dr^a Ralciane de Paula Menezes, Dr. Marcelo Freitas Mendonça, pela revisão e orientações que contribuíram com o trabalho. Aos suplentes da banca de qualificação e defesa: Prof. Dr^a Sabrina Royer e Prof. Dr^a Renata, muito obrigada!!

À FAPEMIG e ao CNPq pelo apoio financeiro;

Enfim, agradeço a todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram com sua amizade e com sugestões efetivas para a realização deste trabalho gostaria de expressar minha profunda gratidão.

Muito obrigada!

*“Nenhum obstáculo é grande demais quando
confiamos em Deus!”*

*“A humildade é o primeiro degrau
da escada para a sabedoria!”*

São Tomaz de Aquino

LISTA DE ABREVIATURAS

AIM-1 - *Australian Imipenemase*

AmpC – Cefalosporinase

BSI - Bloodstream Infection

CNPQ – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CI - Confidence Interval

CVC – Cateter Venoso Central

DDD - Dose Diária Definida

DIM-1 - *Dutch imipenemase*

ECDC – European Centre For Disease Prevention Control

ESBL - Metalo β -lactamases de Amplo Espectro

ExoS – Exoenzima S

ExoT – Exoenzima T

ExoU – Exoenzima U

ExoY – Exoenzima Y

FAPEMIG – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

FDA - Food and Drug Administration

GIM - *German Imipenemase*

GNB - Gram-negative Bacilli

HAI - Health Care Associated Infections

HC – Clinical Hospital

ICS – Infecção de Corrente Sanguínea

ICU – Intensive Care Unit

IMP - *Imipenemase*

IRAS – Infecção Relacionada a Assistência à Saúde

KHM - *Kyorin University Hospital*

KPC - *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase

LMICs - Lower And Middle-Income Countries

LPS – Lipopolissacarídeo

MBL - Metallo B-lactamases

MDR – Multidrug-resistant

MLST - Tipagem de Sequência Multilocus

MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à metilina

MV - Mechanical Ventilation

NDM-1 - New Delhi MBL

OMS – Organização Mundial de Saúde

OR - Odds Ratio

PA – *Pseudomonas aeruginosa*

PAV - *Pneumonia Associada a Ventilação Mecânica*

PCR - Reação em Cadeia pela Polimerase

PDR – Pandrug-resistant

PFGE - Eletroforese em Gel de Campo Pulsado

qRT-PCR - Reação em Cadeia pela Polimerase em Tempo Real

RAPD-PCR - Polimorfismo do DNA Amplificado Aleatoriamente

RFLP - Polimorfismo no Tamanho dos Fragmentos de Restrição

RND - *Resistance-Nodulation-Cell Division*

SENTRY - *Antimicrobial Surveillance Program*

SIM-1 - *Seul Imipenemase*

SPM-1 - *São Paulo MBL*

TMB-1 - *Tripoli Metallo-beta-lactamase*

T3SS – Sistema de Secreção Tipo Três

T1SS - Sistema de Secreção Tipo I

T2SS - Sistema de Secreção Tipo II

T3SS - Sistema de Secreção Tipo III

T5SS - Sistema de Secreção Tipo V

T6SS - Sistema de Secreção Tipo VI

UFU – Universidade Federal de Uberlândia

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

VIM - *Verona Imipenemase*

VM – Ventilação Mecânica

XDR – Extensivedrug-resistant

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figure 1: Survival curve (30 days) using the Kaplan–Meier method for patients who received antimicrobial appropriate therapy compared to those who received inappropriate therapy.....	empirical	80
Figure 2: Survival curve (5 days) using the Kaplan–Meier method for patients who received antimicrobial appropriate therapy compared to those who received inappropriate therapy.....	empirical	80
Figure 1: Survival curve (30 days) using the Kaplan–Meier method for patients who received antimicrobial appropriate therapy compared with those who received inappropriate therapy.....	empirical therapy	103
Figure 1: Survival curve for patients with infection by <i>P. aeruginosa</i>		116
Figure 1: Survival curve using the Kaplan–Meier method.....		130

LISTA DE TABELAS

Table 1 - Risk factors associated with 5 and 30-day mortalities in patients with infections caused by carbapenem-resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	78
Table 2. Characterization of carbapenem-resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isolated from clinical specimens and relation to metallo- β -lactamase production, Type III Secretion System genotype, resistance profile and virulence factors	82
Table 1: Univariate and multivariate analysis of factors associated with the mortality of 87 patients with bloodstream infection caused by Carbapenem Resistant <i>P. aeruginosa</i>	102
Table 1: Risk factors for Antibiotic empirical therapy Inappropriate and evolution of Patients with the <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistant to carbapenemics.....	113
Table 1: Distribution of the type III secretion system-related genotypes among <i>Pseudomonas aeruginosa</i> strains isolated from the Healthcare-associated infections.	126
Table 2: Characteristics of patients with <i>Pseudomonas aeruginosa</i> infections according to T3SS III virulence genotype.....	128

RESUMO

Introdução: *Pseudomonas aeruginosa* está frequentemente envolvida com infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) no Brasil, altas taxas de mortalidade e possui uma grande capacidade de desenvolver ou adquirir resistência aos antimicrobianos. **Objetivos:** Este estudo investigou o impacto da terapia antimicrobiana inapropriada na evolução de pacientes com infecção por *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos e sua associação com genes responsáveis por codificarem as metalo- β -lactamases (*bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SIM}, *bla*_{GIM}, *bla*_{SPM}, *bla*_{NDM}) e exotoxinas do Sistema de Secreção Tipo III (T3SS III) - *exoS*, *exoT*, *exoU* e *exoY*. **Material e Métodos:** Foi realizada uma coorte retrospectiva para determinar os fatores de risco para mortalidade em 30 dias e o impacto da terapia empírica inapropriada em pacientes com primeiro episódio infeccioso por *P. aeruginosa* (262 pacientes). Os genes *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SIM}, *bla*_{GIM} e *bla*_{SPM}, os genes do T3SS III (*exoT*, *exoS*, *exoY*, *exoU*) foram detectados por PCR. **Resultados:** Os resultados obtidos foram assustadores quando se trata da taxa de mortalidade. Observou-se que 17,9% dos pacientes com infecção morreram em até 5 dias do diagnóstico e a taxa de terapia empírica inapropriada foi de 52,7% e esteve associada ao pior prognóstico. A maioria dos pacientes incluídos no estudo apresentou infecção por *P. aeruginosa* multirresistente (59,5%). Além disso, pacientes com comorbidades que desenvolveram infecções por *P. aeruginosa* apresentaram maiores chances de receberem terapia empírica inapropriada e a taxa de mortalidade foi significativamente maior nesse grupo (75,5%). Além da Terapia empírica inapropriada, o tempo de hospitalização prolongado; a presença de comorbidades como: neoplasia, nefropatia e cardiopatia; uso de dispositivos invasivos, foram fatores independentes para a mortalidade precoce. Os resultados são ainda mais significativos considerando que 64,5% dos isolados apresentaram gene T3SS, sendo a *exoT* o gene mais comum. Apesar do gene *exoU* ter sido encontrado em menos de 20% dos isolados avaliados, esse genótipo foi significativamente mais frequente entre amostras multirresistentes (80%) e associado com pior prognóstico em 46,7% dos casos. **Conclusões:** Estes resultados demonstram que *P. aeruginosa* continua sendo um dos patógenos mais importantes no ambiente hospitalar, acometendo na sua maioria pacientes críticos. Aqui, percebemos que a terapia antimicrobiana inapropriada está intimamente relacionada com o pior prognóstico dos pacientes principalmente naqueles com infecções mais graves como bacteremia e pneumonia. Nossos resultados sugerem também que a multirresistência associada com virulência (T3SS III) deve ser adicionada à lista de fatores responsáveis para o aumento das taxas de mortalidade nesses pacientes. Independentemente, da baixa detecção de genes associados à resistência aos carbapenêmicos na nossa coorte, a importância da combinação de mecanismos que levam a resistência deve ser considerada e estudada. Este estudo torna-se fundamental para que, em um futuro próximo, novas estratégias possam ser formuladas e implementadas a fim de diminuir a taxa de infecção por *P. aeruginosa* multirresistente, a prescrição de terapia empírica inapropriada e, conseqüentemente, reduzir de forma significativa as taxas de mortalidade.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*, multirresistência, T3SS III, mortalidade hospitalar, resistência aos carbapenêmicos, terapia empírica inapropriada.

ABSTRACT

Introduction: *Pseudomonas aeruginosa* is frequently involved with healthcare-related infections (HAIs) in Brazil, high mortality rates and has a great capacity to develop or acquire resistance to antimicrobials. **Objectives:** This study investigated the impact of inappropriate antimicrobial therapy on the evolution of patients with carbapenem-resistant *P. aeruginosa* infection and its association with genes responsible for encoding metallo- β -lactamases (*bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SIM}, *bla*_{GIM}, *bla*_{SPM}, *bla*_{NDM}) and exotoxins of the Type III Secretion System (T3SS III) - *exoS*, *exoT*, *exoU* and *exoY*. **Material and methods:** A retrospective cohort was performed to determine risk factors for mortality within 30 days and the impact of inappropriate empirical therapy on patients with a first infectious episode due to *P. aeruginosa* (262 patients). The *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SIM}, *bla*_{GIM} and *bla*_{SPM} genes, the T3SS genes (*exoT*, *exoS*, *exoY*, *exoU*) were detected by PCR. **Results:** The results obtained were frightening when it comes to the mortality rate. It was observed that 17.9% of patients with infection died within 5 days of diagnosis and the rate of inappropriate empirical therapy was 52.7% and was associated with a worse prognosis. Most of the patients included in the study had multidrug-resistant *P. aeruginosa* infection (59.5%). Also, patients with comorbidities who developed *P. aeruginosa* infections were more likely to receive inappropriate empirical therapy and the mortality rate was significantly higher in this group (75.5%). In addition to inappropriate empirical therapy, prolonged hospital stays; the presence of comorbidities such as neoplasia, nephropathy and heart disease; the use of invasive devices, were independent factors for early mortality. The results are even more significant considering that 64.5% of the isolates had a T3SS gene, *exoT* being the most common gene. Although the *exoU* gene was found in less than 20% of the isolates evaluated, this genotype was significantly more frequent among multiresistant samples (80%) and associated with a worse prognosis in 46.7% of cases. **Conclusions:** These results demonstrate that *P. aeruginosa* remains one of the most important pathogens in the hospital environment, affecting mostly critical patients. Here, we realize that inappropriate antimicrobial therapy is closely related to the worst prognosis for patients, especially those with more serious infections such as bacteremia and pneumonia. Our results also suggest that multi resistance associated with virulence (T3SS) should be added to the list of factors responsible for increased mortality rates in these patients. Regardless of the low detection of genes associated with resistance to carbapenems in our cohort, the importance of combining mechanisms that lead to resistance must be considered and studied. This study becomes essential so that, shortly, new strategies can be formulated and implemented to decrease the rate of infection by multidrug-resistant *P. aeruginosa*, the prescription of inappropriate empirical therapy and, consequently, significantly reduce the rates of mortality.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, multidrug resistance, T3SS, hospital mortality, resistance to carbapenems, inappropriate empirical therapy.

SUMÁRIO

	APRESENTAÇÃO.....	19
	CAPÍTULO 1 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	23
1	INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE.....	24
2	USO DE ANTIMICROBIANOS.....	28
3	INFECÇÕES POR <i>P. aeruginosa</i> MULTIRRESISTENTES.....	31
4	MECANISMOS DE RESISTÊNCIA.....	33
5	DISSEMINAÇÃO DE CLONES DE ALTO RISCO.....	38
6	VIRULÊNCIA.....	40
7	EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR NA PREVENÇÃO E CONTROLE DE IRAS.....	43
	REFERÊNCIAS	47
	CAPÍTULO II – ARTIGO 1.....	71
	CAPÍTULO III – ARTIGO 2.....	91
	CAPÍTULO IV – ARTIGO 3.....	97
	CAPÍTULO V – ARTIGO 4.....	107
	CAPÍTULO VI – ARTIGO 5.....	121
	CAPÍTULO VII – CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	136
	ANEXO A – PARECER COMITÊ DE ÉTICA COM PESQUISA EM SERES HUMANOS – UFU.....	139
	ANEXO B – FICHA EPIDEMIOLÓGICA.....	145

Infecções relacionadas a assistência à saúde (IRAS) são um problema de saúde pública, que ocorre em hospitais do mundo todo, atraindo a atenção de órgãos governamentais nacionais e internacionais. Em países em desenvolvimento a ocorrência de IRAS chega a ser 20 vezes maior em relação as taxas de países desenvolvidos, fato atribuído a falta de recursos humanos e infraestrutura, uso pouco criterioso e excessivo de antimicrobianos, aliado a dificuldade de realizar medidas de controle, já que até 30% dos casos são em pacientes admitidos em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) (ALP; DAMANI, 2015; PADOVEZE; FORTALEZA, 2014; ZAIDI et al., 2005).

No Brasil, cerca de 15% dos pacientes internados em hospitais desenvolvem IRAS, sendo que a frequência dos sítios mais acometidos varia entre os hospitais de diferentes regiões e por isso são reconhecidas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como grave risco para pacientes internados (WHO, 2011). Piorando ainda mais a situação, essas infecções podem ser causadas por bactérias multirresistentes, e por isso são reconhecidas como grave risco para pacientes internados. Uma vez que o Brasil é um país de dimensões continentais e, conseqüentemente com grande diversidade de hospitais, ainda permanecem lacunas e dificuldades no conhecimento da epidemiologia (clássica e molecular) das IRAS causadas por microrganismos multirresistentes em território nacional (BOTELHO; GROSSO; PEIXE, 2019; HORCAJADA et al., 2019).

Quanto a etiologia, a literatura mostra que infecções por bactérias Gram positivas, principalmente *Staphylococcus aureus*, ainda correspondem a maioria das infecções em UTI e enfermarias de países desenvolvidos (PFALLER et al., 2020). No entanto, em países em desenvolvimento a realidade é um pouco diferente, já que bactérias Gram negativas tem sido os principais responsáveis como causa das IRAS (SANTOS et al., 2019; BRAGA et al., 2018; SADER et al., 2016; SOSA et al., 2010).

Entre os principais microrganismos causadores de IRAS no país e no mundo, *Pseudomonas aeruginosa* destaca-se por ser um patógeno que acomete principalmente pacientes imunocomprometidos, incluindo aqueles com comorbidades, especialmente quando internados em UTI (PONCE DE LEON et al., 2020; GONÇALVES et al., 2017). A importância clínica de infecções por *P. aeruginosa* está associada com sua difícil erradicação, considerando que as opções para tratamento de infecções graves são limitadas devido a incidência cada vez maior de isolados multirresistentes (MDR), extensivamente resistentes (XDR) e pan-resistentes (PDR) no ambiente hospitalar (SADER et al., 2018; WALKTY et al., 2017; PENA et al., 2015). Esses fenótipos associados as IRAS, colaboram para o aumento das taxas de morbimortalidade,

do tempo de hospitalização e dos custos com o paciente (PONCE DE LEON et al., 2020; GONÇALVES et al., 2017). *P. aeruginosa* também pode sobreviver no ambiente por longos períodos de tempo, o que contribui significativamente para a transmissão pessoa-a-pessoa, além da sua disseminação levando ao aparecimento de surtos hospitalares (BOTELHO; GROSSO; PEIXE, 2019; MORADALI et al., 2017; GELLATLY; HANCOCK, 2013; SILBY et al., 2011).

Cada vez mais, para completar a falta de dados existentes na epidemiologia das IRAS causadas por microrganismos MDR, com destaque para aquelas causadas por *P. aeruginosa*, e justificar seu sucesso no ambiente hospitalar, causando infecções relacionadas com alta mortalidade, pesquisadores do mundo todo vem trabalhando em metodologias e técnicas mais modernas e precisas. Dessa forma, podemos avançar no conhecimento epidemiológico e molecular da disseminação de patógenos resistentes. Estudos já realizados pelo nosso grupo de investigação têm adotado metodologias importantes no monitoramento de bactérias Gram negativas multirresistentes de importância epidemiológica, incluindo *P. aeruginosa*, elucidando fatores que possam contribuir para manutenção desses microrganismos em diversos ecossistemas, e fornecendo informações que podem potencializar estratégias de prevenção e controle de infecções causadas por esses patógenos.

A presente tese de Doutorado foi realizada no Laboratório de Microbiologia Molecular do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Embora a maioria das metodologias utilizadas nesse estudo tenham sido empregadas nesse laboratório, a equipe contou com a colaboração fundamental da Comissão de Controle de Infecção do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Assim, este trabalho teve como objetivos principais:

- 1 - Avaliar a ocorrência de infecções por *P. aeruginosa* diagnosticadas no Hospital de Clínicas (HC) da UFU;
- 2 – Determinar a taxa de mortalidade por *P. aeruginosa* resistente à carbapenêmicos no HC-UFU durante os anos de estudo;
- 3 - Avaliar os principais preditores de mortalidade e o impacto da terapia antimicrobiana inapropriada na evolução clínica dos pacientes;
- 4 - Determinar os genes responsáveis por codificarem as metalo- β -lactamases (*bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SIM}, *bla*_{GIM}, *bla*_{SPM}, *bla*_{NDM});

5 - Determinar a frequência dos genes codificadores das exotoxinas do Sistema de Secreção Tipo III (*exoS*, *exoT*, *exoU* e *exoY*).

Esta tese foi subdividida em sete capítulos, conforme apresentado a seguir:

Capítulo I: Fundamentação Teórica

Capítulo II: artigo 1 - High mortality by nosocomial infections caused by carbapenem-resistant *P. aeruginosa* in a referral hospital in Brazil: Facing the perfect storm.

Capítulo III: artigo 2 - The rising problem of hospital antimicrobial resistance and the challenges of Antibiotic Prescription in Brazil

Capítulo IV: artigo 3 - Bloodstream infection caused by carbapenem-resistant *P. aeruginosa*: impact of inappropriate empirical therapy in a referral hospital in Brazil.

Capítulo V: artigo 4 - Inappropriate empirical antibiotic treatment in patients with infections by *Pseudomonas aeruginosa* in the era of multidrug resistance.

Capítulo VI: artigo 5 – Weighting the impact of genotype type III secretion system virulence on the outcome of Carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections.

Capítulo VII – Considerações finais. Principais conquistas obtidas com o estudo, contribuições e aplicabilidade dos resultados da pesquisa.

Os Capítulos II e III incluem os artigos que foram publicados nas revistas *Journal of Medical Microbiology* e *Journal of Chemotherapy*, respectivamente. Por fim, os capítulos IV, V e VI incluem os artigos a serem submetidos.

Capítulo I

Fundamentação teórica

1 INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE

Infecções relacionadas a assistência à saúde são um problema de saúde pública, que ocorre em hospitais do mundo todo. Esse tipo de infecção chama a atenção de órgãos de saúde de vários países por acarretar aumento nos custos de hospitalização de pacientes e por apresentar elevadas taxas de morbimortalidade (ANVISA, 2013a; ANVISA 2013b; BARSANTI 2009). Trata-se de uma questão tanto biológica, histórica e social que impacta diretamente na segurança em assistência à saúde e representa um dos principais desafios mundiais para qualidade dos cuidados em saúde (OLIVEIRA; SILVA; LACERDA, 2016).

O reconhecimento da magnitude e dos fatores relacionados à incidência de IRAS em nível regional, nacional ou supranacional é componente essencial de qualquer estratégia para seu enfrentamento (PITTET; DONALDSON, 2006). Com isso vários aspectos devem ser considerados, dentre eles os fatores de risco que favorecem o desenvolvimento dessas infecções. De acordo com a literatura, alguns fatores de risco para o desenvolvimento de IRAS são citados com maior frequência: idade mais avançada; gravidade da doença de base; presença de comorbidades, como diabetes; uso prolongado de antimicrobianos, especialmente aqueles de amplo espectro que podem exercer uma pressão seletiva, resultando na emergência de isolados multirresistentes; realização de procedimentos invasivos, tais como: uso de cateter venoso central (CVC), ventilação mecânica (VM), sondagem nasogástrica e vesical e intubação endotraqueal; tempo de hospitalização prolongado; falta e/ou falha nas medidas de prevenção, dentre outros (PAPAZIAN; KLOMPAS; LUYT, 2020; PONCE DE LEON et al., 2020; BRAGA et al., 2018; GONÇALVES et al., 2017).

As UTIs são consideradas núcleos de emergência e disseminação de microrganismos resistentes aos antimicrobianos, portanto, a internação nessas unidades também é considerada um fator de risco importante para o desenvolvimento de infecções hospitalares. Pacientes admitidos nessas unidades apresentam notoriamente estado de saúde mais grave, seja pelo fato de terem realizado algum procedimento cirúrgico, ou por terem comorbidades crônicas mais sérias, ou ainda por apresentarem *scores* de gravidade clínica mais elevados, apresentando, portanto, um comprometimento imunológico maior e, na maioria dos casos, necessidade de utilização de vários dispositivos invasivos por tempo prolongado (MONTERO et al., 2020; PAPAZIAN; KLOMPAS; LUYT, 2020; SANTOS et al., 2019; ALP; DAMANI, 2015). Além disso, nessas unidades também existe uma alta frequência de contato profissional-paciente, e isso favorece muito a transmissão e disseminação de patógenos epidemiologicamente importantes, principalmente aqueles multirresistentes. Ainda associado, a baixa adesão à

higienização das mãos, bem como a sobrecarga de trabalho dos profissionais de saúde, aliada ainda a diversos problemas estruturais, fazem com que essas unidades sejam muito problemáticas nesses países (ALP; DAMANI, 2015; MOREIRA et al., 2013).

Nos países com poucos recursos financeiros, fazendo referência especial ao Brasil, os dados sobre as taxas de IRAS, e os custos hospitalares em decorrência dessas, são limitados e frequentemente de baixa qualidade. Entretanto, existem evidências de que, quando essas infecções são associadas a procedimentos invasivos, essas taxas elevam-se substancialmente, mesmo nos países desenvolvidos (ALLEGIANZI et al., 2011). A literatura tem mostrado poucos estudos de vigilância nacionais ou multicêntricos em países com poucos recursos financeiros (ALP; DAMANI, 2015; ALLEGIANZI et al., 2011; ROSENTHAL et al., 2006).

Na América Latina, importantes dados de um programa de vigilância de resistência a antimicrobianos, (*SENTRY Antimicrobial Surveillance Program*), tem mostrado variações nas taxas de IRAS causadas por germes resistentes ao longo do tempo (GALES et al., 2012). No Brasil, poucos trabalhos multicêntricos são importantes de serem mencionados no que se refere ao controle e prevenção de IRAS, com destaque para o estudo de Starling; Couto; Pinheiro (1997), Rosenthal et al. (2012), Padoveze et al. (2010), Fortaleza et al. (2017) e Braga et al. (2018). Em países em desenvolvimento a ocorrência de IRAS chega a ser 20 vezes maior em relação as taxas de países desenvolvidos, fato atribuído a falta de recursos humanos, infraestrutura e medidas de controle, já que até 30% dos casos são em pacientes admitidos em UTI (ALP; DAMANI, 2015; PADOVEZE; FORTALEZA, 2014; ZAIDI et al., 2005).

No Brasil, há pesquisas que observaram o trato urinário como sendo o mais acometido, seguido do trato respiratório, corrente sanguínea e sítio cirúrgico, já em outros estudos, Infecção de Corrente Sanguínea (ICS) foi mais comum, seguido de pneumonia (BRAGA et al., 2018; ANVISA, 2013a; ANVISA 2013b; OLIVEIRA et al., 2012). Um importante estudo foi realizado nos hospitais brasileiros no período de 2011-2013, envolvendo hospitais de diferentes tamanhos de 10 estados localizados nas cinco macrorregiões do Brasil, compreendendo 152 hospitais (FORTALEZA et al., 2017). Esse estudo descreveu uma prevalência geral de IRAS de 10,8%, sendo que a região norte do Brasil apresentou maior predomínio (12,2%) dessas infecções, seguido pela região centro-oeste (11,3%), região sudeste (10,2), nordeste (9,3%) e sul (8,3%). Em relação ao tipo de infecção, a pneumonia foi a mais frequente (3,6%), seguida por infecções de corrente sanguínea (2,9%), infecções do sítio cirúrgico (1,5%) e infecções do trato urinário (1,4%), sendo que a maior frequência das síndromes infecciosas foi encontrada em recém-nascidos, lactantes e idosos (FORTALEZA et al., 2017).

Quando observamos os estudos voltados para UTIs, como o de Braga e colaboradores (2018), realizado em 28 UTIs localizadas no estado de Minas Gerais no Brasil, observou-se prevalência superior de IRAS (51,2%) comparada com Estados Unidos (6,1%) e Europa (48,4%), mas semelhantes a outros estudos brasileiros (RICHARDS, et al., 1999; VINCENT, et al., 2009; BRAGA et al., 2018). Esta investigação também revelou que pneumonia foi tipo de infecção mais frequente, seguido por infecções da corrente sanguínea e infecções do trato urinário, que juntas representaram 90,8% de todas as infecções nosocomiais (BRAGA et al., 2018).

Os pulmões constituem um dos principais sítios de infecção adquirada em ambiente hospitalar, especialmente quando o paciente está em uso de ventilação mecânica. Quando a ocorrência dessa infecção se dá após 48 horas de uso de VM ou do processo de intubação endotraqueal, é denominada Pneumonia Associada a Ventilação Mecânica (PAV) (PAPAZIAN; KLOMPAS; LUYT, 2020). Isso, porque, a presença desses dispositivos comprometem os mecanismos de defesa do indivíduo, como a tosse e a barreira muco-ciliar, favorecendo a microaspiração de secreções da orofaringe colonizadas por microrganismos potencialmente patogênicos como *P. aeruginosa* (PAPAZIAN; KLOMPAS; LUYT, 2020; JOSEPH et al., 2010). A PAV é considerada entre as IRAS a mais frequente, adquirida em UTIs, com uma incidência variando de 6 a 52% (JOSEPH et al., 2010), e está associada com o tempo de ventilação e período de internação longo, resultando em maior mortalidade e custos hospitalares (CHAN; GRAVES; DELLIT, 2010). A importância clínica da PAV tem sido demonstrada por recentes estudos de vigilância que mostram que esta é uma infecção comum em todos os continentes (ARABI et al., 2008; LEYLABADLO et al., 2017; POURMAND et al., 2017). Estudos mostram que a taxa de PAV em hospitais da América do Norte varia entre 1 e 2,5 casos por 1000 ventilações-dia (DUDECK et al., 2013). Na Europa a taxa de incidência de PAV é um pouco maior, chegando a 18,3 episódios/1000 ventilações-dia em alguns hospitais (KOULENTI; TSIGOU; RELLO, 2017) e está associada a uma elevada taxa de mortalidade (DENIS et al., 2019). Em países em desenvolvimento a ocorrência de PAV também é elevada (SOUZA et al., 2017; RESENDE et al., 2013). No Brasil, estudos realizados em hospitais terciários no Nordeste encontraram uma frequência de PAV variando entre 26,2% e 42,1%. No HC-UFU, pesquisadores observaram que a mortalidade associada a PAV foi alta, ficando acima de 50% (ROYER et al., 2015).

Além das PAVs, as infecções de corrente sanguínea, estão entre as IRAS mais graves e frequentes no ambiente hospitalar, e também são associadas a taxas elevadas de mortalidade e

tempo de hospitalização prolongado (LAUPLAND et al., 2020; MITT et al., 2009). O aumento observado nas taxas dessas infecções nas últimas décadas, pode estar relacionado a utilização frequente de cateter venoso central, que é considerado o principal fator de risco para o desenvolvimento desse tipo de infecção (LAUPLAND et al., 2020; KAYE et al., 2010). As bacteremias são classificadas em primárias e secundárias. Nas primárias a fonte da infecção não é conhecida, sendo usualmente relacionadas ao uso de Cateter venoso central em mais de um terço dos casos (LEAL et al., 2019; VALLÉS et al., 2011; ZARKOTOU et al., 2011). No Brasil, as bacteremias primárias correspondem a maioria dos casos de ICS, sendo relatadas taxas entre 65,9% e 75,7% (LEAL et al., 2019; GONÇALVES et al., 2017). Estando relacionadas a outros sítios anatômicos, como pulmões, trato geniturinário, ferida de sítio cirúrgico, dentre outros, são denominadas de bacteremias secundárias (MAYER, et al., 2012; PELEG; HOOPER, 2010).

Infecções por bactérias Gram positivas, principalmente *Staphylococcus aureus*, ainda correspondem a maioria das infecções em UTI e enfermarias de países desenvolvidos (PFALLER et al., 2020). No entanto, um estudo realizado pelo SENTRY entre 2010 e 2016, envolvendo hospitais dos Estados Unidos e da Europa, verificou que bactérias Gram negativas já são responsáveis por 46 e 57% dos casos de IRAS nestes locais, respectivamente (MENDES et al., 2018). Já em estudo semelhante na América Latina mostrou que 53% dos microrganismos isolados eram espécies de Gram negativos, com predomínio das Enterobactérias (SADER et al., 2016). No Brasil, um levantamento epidemiológico realizado em 28 hospitais de nível terciário no estado de Minas Gerais encontrou uma frequência semelhante àquela relatada por Sader e colaboradores (2016) em um estudo na América Latina porém, não fermentadores como *P. aeruginosa* (27%) e *Acinetobacter baumannii* (27%), seguidos por *Escherichia coli* (19%) foram as espécies mais isoladas (BRAGA et al., 2018).

Esses relatos revelam uma tendência de aumento das taxas de infecções em pacientes hospitalizados no mundo todo, especialmente em países em desenvolvimento, onde a frequência de infecções por bactérias Gram negativas tem sido cada vez mais significativa, sendo comum relatos desses microrganismos como os principais patógenos isolados de infecções nosocomiais (SOSA et al., 2010).

Nesse cenário, *P. aeruginosa* tem emergido como um dos principais patógenos responsáveis pela ocorrência de IRAS, colaborando para o aumento das taxas de morbimortalidade, do tempo de hospitalização e dos custos com o paciente (PONCE DE LEON et al., 2020; GONÇALVES et al., 2017). Levantamentos epidemiológicos realizados em diversos países mostram que aproximadamente 10% do total de IRAS são causadas por *P.*

aeruginosa, além de ser o principal agente responsável pelos casos de pneumonia em hospitais brasileiros, ter participação importante nas infecções de trato urinário, corrente sanguínea e sítio cirúrgico (SANTOS et al., 2019; BRAGA et al., 2018; DORTET; POIREL; NORDMANN, 2012).

Estudos epidemiológicos realizados em países europeus apontam *P. aeruginosa* como o principal microrganismo responsável por episódios de pneumonia, infecções do trato urinário e ICS adquiridas em UTI (ECDC, 2018). Pesquisas de prevalência pontual de IRAS e uso de antimicrobianos em instalações de cuidados prolongados e hospitais de cuidados agudos europeus revelam que *P. aeruginosa* foi a espécie isolada com maior frequência nos casos de IRAS (ECDC, 2014; ECDC, 2013a).

A ocorrência de IRAS torna-se ainda mais preocupante quando são ocasionadas por microrganismos resistentes a ação de antimicrobianos, alvo de grande preocupação da medicina mundial, em consequência da limitação de opções terapêuticas e da piora no prognóstico dos pacientes que isso desencadeia. Nesse sentido, *P. aeruginosa* tem se destacado no cenário mundial (SANTOS et al., 2019; SHORTRIDGE et al., 2019).

Diante do exposto, conclui-se que as IRAS são uma das maiores causas de morbimortalidade em hospitais ao redor do mundo. Por isso, faz-se necessário adotar medidas de controle destas infecções, incluindo a observação de pacientes de risco, higienização das mãos, seguindo as precauções e estratégias padrão para reduzir a transmissão cruzada de microrganismos, além de uma eficiente vigilância de controle de infecção hospitalar (DIAS, 2019). Globalmente, essas infecções requerem cuidado especial devido a emergência e disseminação de microrganismos que expressam resistência a uma ampla variedade de antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções hospitalares (CORNEJO-JUÁREZ et al., 2015).

2 USO DE ANTIMICROBIANOS

Diversas pesquisas apontam que essa resistência a antimicrobianos, está diretamente relacionada ao seu uso indiscriminado, especialmente em ambiente hospitalar (CHOU et al., 2020; HORCAJADA et al., 2019; RUIZ et al., 2018; DORON; LISA; DAVIDSON, 2011). Além disso, outras condições podem estar ligadas ao surgimento e disseminação de microrganismos resistentes, tais como: internação em UTI, transferência de pacientes de uma unidade de atendimento médico para outra ou de uma comunidade para outra, tempo

prolongado de hospitalização, alta taxa de utilização de dispositivos invasivos, colonização prévia e baixa adesão de profissionais de saúde as medidas de controle de IRAS (DANTAS et al., 2017; LABARCA et al., 2016; DANTAS et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2012).

Oito categorias de antimicrobianos são utilizadas atualmente no tratamento de infecções por *P. aeruginosa*: aminoglicosídeos (gentamicina, ampicacina, netilmicina, tobramicina), carbapenêmicos (imipenem, meropenem, doripenem), cefalosporinas (ceftazidima), fluoroquinolonas com inibidores da β -lactamase (tetraciclina com ácido clavulânico, piperacilina-tazobactam), monobactamas (aztreonam), ácidos fosfônicos (fosfomicina) e polimixinas (colistina e polimixina B). Além disso, antimicrobianos mais novos como ceftazidima-avibactam e ceftolozane-tazobactam já foram aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) e estão disponíveis para uso (BOTELHO; GROSSO; PEIXE, 2019; BASSETTI et al., 2018; NGUYEN et al., 2018).

Apesar dessa gama de antimicrobianos elegíveis para o tratamento de infecções por *P. aeruginosa*, a classe dos carbapenêmicos, especialmente os antimicrobianos imipenem e meropenem, constitui o grupo de primeira escolha, já que não são hidrolisados pela maioria das beta-lactamases de espectro estendido (BOTELHO; GROSSO; PEIXE, 2019; HORCAJADA et al., 2019; GALES et al., 2012). Entretanto, a utilização desses antimicrobianos tem sido ameaçada em virtude do número cada vez maior de amostras clínicas resistentes aos carbapenêmicos (CHOU et al., 2020; HORCAJADA et al., 2019; HO et al., 2013; CHANG et al., 2009). No Brasil, vários grupos independentes de pesquisa têm relatado que as taxas de resistência ao imipenem entre isolados de *P. aeruginosa* podem ser superiores a 60% em alguns hospitais (QUILES et al., 2017; MATOS et al., 2016).

Muitas vezes essa resistência pode estar associada a uma ou mais fatores, tornando importante o conhecimento desses mecanismos de resistência e qual o fenótipo predominante em cada região para propor medidas alternativas de tratamento e prevenção de infecções desencadeadas por *P. aeruginosa* (HORCAJADA et al., 2019).

Nesse cenário, estudos que buscam estabelecer a relação entre o uso indiscriminado de antimicrobianos e a seleção de isolados resistentes através da Dose Diária Definida (DDD) tem sido desenvolvido nos últimos anos (ONG et al., 2011). Isso, porque a DDD é considerada um bom marcador para avaliação do consumo de antimicrobianos e evita o viés paciente e número, possibilitando a comparação entre as taxas de microrganismos e os fenótipos de resistência e o uso de antimicrobianos entre diferentes países (MONNET; MÖLSTAD; CARS, 2004). Um

estudo conduzido por Chou e colaboradores (2020) observou uma relação entre o aumento da DDD para cefepime, imipenem e ciprofloxicina e a redução da susceptibilidade dos isolados de *P. aeruginosa*. Desse modo, os autores afirmam que o uso excessivo de agentes antimicrobianos promove uma falha terapêutica bastante alta, a qual está diretamente relacionada a resistência antimicrobiana. Assim, os pesquisadores ainda sugerem que esforços adicionais para a vigilância de várias opções de tratamento são necessários, além de implantação de estratégias para administração de antimicrobianos, com intuito de controlar a disseminação da resistência (CHOU et al., 2020).

De acordo com a literatura, um terço dos pacientes hospitalizados recebem terapia antimicrobiana, e sabe-se que em cerca de 50% seu uso é desnecessário (MARTINEZ-NADAL et al., 2020; MONTERO et al., 2020; GARCIA-VIDAL et al., 2018; KIM et al., 2014). Os erros mais frequentes são observados quando do uso profilático desses medicamentos, considerando que uma proporção substancial dos antibióticos prescritos nos hospitais é de uso profilático (CHOU et al., 2020; POPOVIĆ et al., 2020). Com isso, podemos listar reações adversas, emergência de resistência e aumento nos custos do tratamento, como algumas consequências indesejadas quanto ao uso incorreto de antimicrobianos (CHOU et al., 2020; MARTINEZ-NADAL et al., 2020; MONTERO et al., 2020; POPOVIĆ et al., 2020).

O uso excessivo e inadequado de antimicrobianos, principalmente aqueles de amplo espectro, determinam maior pressão seletiva e aliado as dificuldades na implantação das medidas de prevenção de controle das IRAS, acabam se tornando os principais fatores responsáveis pela emergência de agentes cada vez mais resistentes em unidades que apresentam elevada densidade de uso desses antimicrobianos, como as UTIs (CHOU et al., 2020; MARTINEZ-NADAL et al., 2020; MONTERO et al., 2020; POPOVIĆ et al., 2020). Estudos realizados na última década no Clinical Hospital da Universidade Federal de Uberlândia relatam o uso excessivo de antimicrobianos em pacientes críticos, além de uma elevada taxa de Terapia empírica inapropriada relacionada a mortalidade (GONÇALVES et al., 2017; FERREIRA et al., 2015; ROYER et al., 2015).

Além dessa vigilância ativa, deve-se incentivar o uso racional dos antimicrobianos existentes, especialmente os de amplo espectro, como também alocar mais recursos para pesquisas básica e clínica e desenvolvimento de novos fármacos, para o efetivo controle e possível redução de microrganismos multirresistentes, como ainda para obtenção de êxito no tratamento das infecções (HORCAJADA et al., 2019).

3 INFECÇÕES POR *P. aeruginosa* MULTIRRESISTENTES

É notório o aumento de infecções por microrganismos resistentes em todo o mundo, situação importante que impacta diretamente na elevação das taxas de morbimortalidade de pacientes hospitalizados. Essa condição representa uma ameaça à saúde e a economia de diversos países, em virtude da falta de uma terapia eficaz (HORCAJADA et al., 2019; BOGAN et al., 2014; KOSMIDIS; CHANDRASEKAR, 2012; PELEG; HOOPER, 2010; BOUCHER et al., 2009; LIVERMORE, 2009). Esse cenário passa a ser ainda mais ameaçador considerando que esses microrganismos estão se disseminando entre animais e humanos, bem como entre os diferentes ecossistemas, causando surtos graves (von WINTERSDORFF et al., 2016). Nesse contexto, países como o Brasil tem sofrido mais, e isso é mostrado nas inúmeras publicações nacionais e internacionais disponibilizadas, em que principalmente bactérias Gram negativas são o foco principal (BOSZCZOWSK et al., 2019; DAGA et al., 2019; LEAL et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2019; MATOS et al., 2016, FERREIRA et al., 2015).

Epidemiologicamente falando, a referência a esses microrganismos tem sido classificada seguindo terminologias padronizadas mais recentemente, como a descrita por Magiorakus et al. (2012) em que: microrganismos multirresistentes (MDR), fazendo referência aqueles isolados que apresentam resistência a pelo menos um agente em três ou mais categorias de antimicrobianos. Microrganismos extensivamente resistentes (XDR) como sendo aqueles que apresentam resistência a pelo menos um antimicrobiano de todas as classes, podendo excluir no máximo duas categorias. E, por fim, microrganismos pan-resistentes (PDR) como sendo aqueles que apresentam resistência a todos os antimicrobianos de todas as categorias existentes.

Muitos microrganismos com fenótipos resistentes, com destaque para o *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) entre os cocos Gram-positivos e *K. pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* resistentes aos carbapenêmicos entre os bacilos Gram negativos, estão entre os microrganismos com grande risco para o desenvolvimento de infecção, principalmente entre pacientes críticos (PFALLER et al., 2020; BRAGA et al., 2018; MENDES et al., 2018; SADER et al., 2016). Neste contexto, como mencionado anteriormente, tem-se observado aumento importante da incidência de IRAS causadas por bactérias Gram negativas multirresistentes, com destaque para *P. aeruginosa*. Esse microrganismo tem sido uma ameaça nos últimos anos, principalmente entre os pacientes críticos, uma vez que esse patógeno está associado a difícil erradicação e fracassos terapêuticos contínuos (MONTERO et al., 2020; POPOVIĆ et al., 2020; SADER et al., 2016).

P. aeruginosa é considerada um patógeno extremamente problemático por ser versátil e responsável por infecções hospitalares com taxas elevadas de morbimortalidade, podendo estar associada frequentemente a terapia antimicrobiana inadequada (CHOU et al., 2020; MONTERO et al., 2020; BOTELHO; GROSSO; PEIXE, 2019; MORADALI et al., 2017). Além disso, esse microrganismo também é responsável por diversos surtos descritos no Brasil (MACIEL et al., 2017; QUILES et al., 2017; ARAÚJO et al., 2016).

No ambiente hospitalar, a prevalência desse microrganismo tem sido também fortemente documentada, como demonstrado nos estudos de Balkhair et al. (2019), Quiles et al. (2017) e Santos et al. (2019). Outros estudos mostraram níveis crescentes de resistência em *P. aeruginosa*, sendo observado uma prevalência cada vez maior de isolados MDR e XDR, com taxas variando entre 15 e 30% em alguns países (SADER et al., 2018; WALKTY et al., 2017; PENA et al., 2015). De acordo com dados do ECDC, em 2015 cerca de 14% dos isolados de *P. aeruginosa* recuperados de infecções nosocomiais eram MDR e aproximadamente 6% XDR (ECDC, 2015). Nos Estados Unidos, *P. aeruginosa* MDR já são responsáveis por 13% das IRAS (CDC, 2013).

Estudos realizados no Brasil encontraram uma taxa de mortalidade associada a infecção por *P. aeruginosa* multirresistente próxima a 50%, com a maioria dos pacientes evoluindo para o óbito em até 30 dias após a infecção (DIAS et al., 2017; ARAÚJO et al., 2016). Em países do Oriente Médio a mortalidade chega a 60% (BALKHAIR et al., 2019), enquanto que em países da Ásia essa taxa é de 20% (TSAO et al., 2018; KIM et al., 2014). Essa taxa de mortalidade elevada pode ser explicada pela terapia empírica inadequada, aliada ao início tardio do tratamento correto, sendo incompatível com o antimicrobiano utilizado (RETAMAR et al., 2012; VALLÉS et al., 2011).

Shortridge et al. (2019) em um estudo de 20 anos de vigilância global, observaram que a maioria dos isolados de *P. aeruginosa* com fenótipo MDR foram provenientes da América Latina (41,1%), seguido da Europa (28,4%), América do Norte (18,9%) e Ásia (18,8%).

Em um levantamento epidemiológico realizado em um hospital universitário no interior de Minas Gerais, Dantas e colaboradores (2017) relataram 157 pacientes não repetitivos com bacteremia por *P. aeruginosa*, dos quais 42,7% foram classificados como microrganismos MDR e 22,3% como XDR.

Infelizmente essa situação tem sido cada vez mais comum, principalmente em países em desenvolvimento como o Brasil (BRAGA et al., 2018). Diante desse aumento e das graves consequências trazidas por infecções isolados resistentes, aliado a escassez de dados, de recursos humanos, financeiros, de laboratórios de microbiologia especializados e do emprego da terapia empírica no tratamento dos pacientes, pesquisas que objetivam avaliar isolados multirresistentes, seja do ponto de vista epidemiológico ou laboratorial, devem ser estimuladas (KOLLEF et al., 2005).

Essa facilidade em assumir um papel importante como patógeno hospitalar oportunista está relacionado com sua resistência intrínseca a vários antimicrobianos, aliada a capacidade de expressar diversos fatores de virulência, e a plasticidade genética, citadas anteriormente (BOTELHO; GROSSO; PEIXE, 2019; MORADALI et al., 2017; GELLATLY; HANCOCK, 2013; SILBY et al., 2011).

4 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA

P. aeruginosa pode desenvolver resistência a uma gama de antimicrobianos através da combinação de mecanismos intrínsecos e extrínsecos, que podem ser adquiridos ou adaptativos. Quando a resistência está relacionada às características intrínsecas, o microrganismo é naturalmente menos susceptível a ação de alguns antimicrobianos, devido a à expressão constitutiva de β -lactamases e bombas de efluxo, combinada à baixa permeabilidade da membrana externa. Quando ela ocorre em virtude de mecanismos extrínsecos, o patógeno pode carrear plasmídeos e outros elementos de resistência (BOTELHO; GROSSO; PEIXE, 2019; BASSETTI et al., 2018; NGUYEN et al., 2018; CHEVALIER et al., 2017; MORADALI et al., 2017; OLIVER et al., 2015). Em isolados de *P. aeruginosa* a maioria dos mecanismos de resistência estão relacionados a alterações genéticas como mutações em porinas (diminuição de OprD) associada a redução na expressão do gene ampC cromossomial e superexpressão de bombas de efluxo (DUMAS et al., 2006).

Sabe-se que as porinas são proteínas presentes na membrana externa da célula bacteriana, formando canais que permitem a passagem de solutos, incluindo antimicrobianos, para o interior da célula. Em *P. aeruginosa* já foram detectados diferentes tipos de porinas, sendo a OprD a que apresenta maior importância clínica, visto que sua não expressão na membrana celular está diretamente relacionada com a resistência intrínseca aos carbapenêmicos, especialmente ao imipenem, e a menor susceptibilidade ao meropenem

(BOTELHO; GROSSO; PEIXE, 2019; CHEVALIER et al., 2017; CANTÓN; RUIZ-GARBAJOSA, 2011). Estudos indicam que a não expressão de OprD em isolados de *P. aeruginosa* não confere resistência a outros antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos e que esse fenômeno pode ser desencadeado durante a terapia com imipenem (HORCAJADA et al., 2019; LIVERMORE et al., 2002). Um estudo realizado por Quale e colaboradores em 2006 verificou que aproximadamente 85% dos isolados de *P. aeruginosa* resistente a carbapenêmicos, recuperados de infecções nosocomiais, apresentavam expressão reduzida de OprD.

O sistema de bomba de efluxo é um mecanismo de resistência de grande importância para *P. aeruginosa*, que pode ser expresso isoladamente, ou combinado com OprD e cefalosporinas (DANTAS, 2015). Localizado através da membrana citoplasmática, constitui um dos elementos mais antigos das bactérias, estando presente muito antes da era dos antibióticos, sendo responsável por expulsar do interior da célula bacteriana substâncias tóxicas a ela. Por atuar em inúmeros substratos, este sistema é de extrema importância para o desenvolvimento da resistência a múltiplos antimicrobianos com ação anti-pseudomonas, incluindo aminoglicosídeos, fluorquinolonas e β -lactâmicos (BOTELHO; GROSSO; PEIXE, 2019; DU et al., 2018; MARTINEZ et al., 2009).

As bombas de efluxo promovem não só aumento da concentração inibitória mínima que deve ser utilizada para alcançar sucesso na terapia antimicrobiana, como ainda reduzem a concentração do antibiótico no interior da célula bacteriana, fazendo com que estas concentrações sub-inibitórias levem ao desenvolvimento de cepas mutantes resistentes (SAIER; PAULSEN, 2001). Esses sistemas de bomba de efluxo apresenta três componentes estruturais: I) proteína transportadora de membrana citoplasmática, que exerce a função da bomba; II) proteína de membrana externa (porina), que constitui o canal extrutivo; III) proteína de fusão localizada no espaço periplasmático, que promove a união dos outros dois constituintes (ASKOURA et al., 2011).

Esses sistemas geralmente são agrupados em cinco famílias e são uma importante causa de resistência em *P. aeruginosa*, sendo os sistemas de maior relevância clínica aqueles pertencentes a família *resistance-nodulation-cell division* (RND): MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexXY e MexEF-OprN, cuja denominação Mex vem do inglês *Multi-drug Efflux Pump* e todos os genes codificadores localizam-se no cromossomo bacteriano (BOTELHO; GROSSO; PEIXE, 2019; VALOT et al., 2015).

MexAB-OprM foi o primeiro sistema de efluxo descoberto e confere uma reduzida susceptibilidade basal a quase todos os β -lactâmicos (exceto imipenem) e a fluoroquinolonas (LI et al., 2015). Por remover da célula bacteriana uma gama de substratos, este sistema é o de maior relevância clínica e o principal contribuinte para desenvolvimento do fenótipo MDR (HORCAJADA et al., 2019; XAVIER et al., 2010).

Assim como MexAB-OprM, MexXY possui expressão constitutiva, justificando o fenótipo intrínseco de multirresistência. MexXY é um sistema importante porque confere redução na susceptibilidade a aminoglicosídeos (BOTELHO; GROSSO; PEIXE, 2019; HORCAJADA et al., 2019; LI; PLÉSIAT; NIKAIDO, 2015).

Dados da literatura mostram que a expressão de MexAB-OprM e MexXY são comuns em isolados clínicos de *P. aeruginosa*, variando entre 10 e 30%, ao passo que a expressão de MexCD-OprJ e MexEF-OprN é bem menor, em torno de 5%, sendo que a hiperexpressão de MexCD-OprJ é mais frequente em infecções crônicas, promovendo uma menor susceptibilidade a cefepime. Além disso, a combinação de superexpressão de MexAB-OprM aliada a inativação de OprD constitui-se como uma das principais causas de resistência ao meropenem em isolados clínicos de *P. aeruginosa* (GUÉNARD et al., 2014; MULET et al., 2011; RIERA et al., 2011). Em um estudo realizado em São Paulo que avaliou isolados clínicos de *P. aeruginosa* produtores de carbapenemases encontrou que a expressão de bombas de efluxo constituiu o principal mecanismo de resistência antimicrobiana (PEREIRA, 2017).

Outro mecanismo de resistência intrínseco importante em *P. aeruginosa* é a produção de uma β -lactamase cromossomal do tipo AmpC (cefalosporinase). Essa enzima é produzida em níveis basais em cepas selvagens e na ausência de β -lactâmicos, conferindo assim, susceptibilidade à penicilina, penicilina associada a inibidores de β -lactamases, cefalosporinas e carbapenemas. Porém, quando exposta a antimicrobianos dessa classe, a exemplo dos carbapenêmicos, a produção de AmpC pode aumentar de forma significativa. Esse aumento é desencadeado através da indução do gene *ampC* ou por desrepressão, resultando em um alto nível de expressão constitutiva, conferindo resistência a antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos, exceto aos carbapenêmicos, porém possivelmente contribui para a resistência de *P. aeruginosa* a essa categoria quando acompanhado de mecanismos adicionais, como a perda de porinas OprD e hiperprodução de bombas de efluxo (BOTELHO; GROSSO; PEIXE, 2019; HORCAJADA et al., 2019; LIVERMORE, 1992).

Além dos fatores de resistência intrínsecos, *P. aeruginosa* também pode apresentar vários mecanismos de resistência adquiridos (seja por mutação ou pela aquisição de genes de resistência via elementos genéticos móveis), especialmente em relação aos carbapenêmicos. Esses mecanismos estão diretamente relacionados com a produção de enzimas inativadoras de antimicrobianos. Essas enzimas podem inibir a ação desses fármacos através de três mecanismos: transferência de grupos (observada em várias classes de antimicrobianos, incluindo fenômenos de fosforilação, glicosilação, ribosilação e transferência de grupos thiol), mecanismos de oxidação (observado na classe das tetraciclinas) e hidrólise (que ocorre, principalmente, com os beta-lactâmicos) (BOTELHO; GROSSO; PEIXE, 2019; HORCAJADA et al., 2019).

A resistência adquirida aos carbapenêmicos também pode estar relacionada a produção de carbapenemases, incluindo aquelas pertencentes a classe A, a exemplo da serino-carbapenemase KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase); aquelas pertencentes a classe D, como a oxa-carbapenemase; e as β -lactamases. A produção de β -lactamases foi o primeiro mecanismo de resistência aos β -lactâmicos reconhecido, e ainda é a principal causa de resistência a essa classe de antimicrobianos observada em bactérias Gram negativas (BOTELHO; GROSSO; PEIXE, 2019; HORCAJADA et al., 2019). O mecanismo de ação dessa enzima baseia-se na hidrólise do anel beta-lactâmico desses antimicrobianos, formando um derivado ácido que não possui atividade terapêutica (LIVERMORE et al., 2002).

As enzimas β -lactamases podem ser classificadas conforme suas características bioquímicas e estruturais (BUSH, 2001; AMBLER, 1980). A classificação mais simples é a de Ambler (1980), que divide as enzimas em quatro classes de acordo com suas estruturas primárias: classe A – β -lactamases de amplo espectro (ESBL), classe B - metalo β -lactamases (MBL), classe C – cefalosporinases e classe D – oxacilinases. Essas quatro classes ainda podem ser divididas em dois grandes grupos: serina β -lactamases (classes A, C e D) e metalo β -lactamases (classe B), de acordo com as diferenças nos seus mecanismos catalíticos. Nesse sentido, destacamos MBL por ser o mecanismo de resistência mais frequente, sendo responsável por elevados níveis de resistência aos carbapenêmicos no Brasil (MACIEL et al., 2017; QUILES et al., 2017; JACOMÉ et al., 2016; MATOS et al., 2016; FERREIRA et al., 2015). No mundo, a distribuição de *P. aeruginosa* produtoras de MBL varia entre as diferentes regiões geográficas, podendo chegar a 50% em países da América Latina, incluindo Brasil, e Europa (PATEL; BONOMO, 2011).

As enzimas β -lactamases geralmente são codificadas por elementos genéticos móveis, como os integrons, transposons e plasmídeos, motivo de preocupação em relação a terapia antimicrobiana, devido à grande capacidade de disseminação desses elementos (DANTAS, 2015). Para MBL, atualmente são descritos genes responsáveis pela codificação de 11 subtipos: IMP (*Imipenemase*), VIM (*Verona Imipenemase*), SPM-1 (*São Paulo MBL*), GIM (“*German Imipenemase*”) e SIM-1 (“*Seul Imipenemase*”) (MENDES et al., 2006), e mais recentemente AIM-1 (*Australian Imipenemase*) (YONG et al., 2007), KHM (“*Kyorin University Hospital*”), NDM-1 (“*New Delhi MBL*”) (YONG et al., 2009), DIM-1 (“*Dutch imipenemase*”) (POIREL et al., 2010) e TMB-1 (*Tripoli Metallo-beta-lactamase*) (EL SALABI et al., 2012), sendo relatada similaridade estrutural entre VIM, IMP, NDM, SPM, DIM, GIM e FIM (HORCAJADA et al., 2019). Os genes *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} e *bla*_{NDM-1} são disseminados por todo o mundo, enquanto *bla*_{SPM-1}, *bla*_{GIM-1}, *bla*_{FIM-1} e *bla*_{AIM-1} estão restritos ao Brasil, Alemanha, Itália e Austrália, respectivamente (CORNAGLIA et al., 2011; OLIVER et al., 2015), embora haja relatos do isolamento de *P. aeruginosa* expressando *bla*_{SPM-1} em indivíduos no Reino Unido e Suíça (HOPKINS et al., 2016; SALABI et al., 2010). Apesar do número considerável de MBL conhecidas, a origem dessas enzimas ainda permanece desconhecida (HORCAJADA et al., 2019).

No Brasil, apesar de existir predomínio de *P. aeruginosa bla*_{SPM-1} e este perfil estar associado a elevadas taxas de mortalidade, já foram relatadas infecções por *P. aeruginosa bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} e surtos por *bla*_{NDM-1} (BONOMO et al., 2018; RIZEK et al., 2014).

Além das MBL, *P. aeruginosa* é capaz de produzir MBL do tipo ESBL, dentre elas SHV, TEM, PER, VEB, BEL, GES, OXA e CTX-M (FARSHADZADEH et al., 2014; PELLEGRINO et al., 2006), sendo que apenas as do tipo GES são capazes de hidrolisar carbapanemas (POIREL et al., 2001).

A detecção de *P. aeruginosa* produtoras de KPC é rara, havendo relatos principalmente no continente americano (SANTOS et al., 2019; CORREA et al., 2012; JACOMÉ et al., 2012). O primeiro relato de infecção por *P. aeruginosa* produtora de KPC no Brasil foi em 2010 na cidade de Recife. À época, o gene *bla*_{KPC} foi detectado em dois isolados de *P. aeruginosa* recuperados de dois pacientes internados na mesma UTI de um hospital terciário e apresentavam perfil de resistência semelhante (JACOMÉ et al., 2012).

Assim como relatado para KPC, a detecção de oxacilinases em isolados de *P. aeruginosa* é algo raro. Até o momento, apenas três carbapenemases da classe D foram descritas nessa espécie: OXA-40, OXA-181 e OXA-198 (BOTELHO; GROSSO; PEIXE, 2019).

5 DISSEMINAÇÃO DE CLONES DE ALTO RISCO

É consenso de que o aumento de infecções desencadeadas por microrganismos resistentes a um ou vários antimicrobianos é um problema grave cada vez mais comum em hospitais de todo o mundo. No entanto, além dessa questão, outro ponto importante que as equipes de controle de infecção hospitalar têm enfrentado é a disseminação de um mesmo isolado clínico entre pacientes de uma mesma unidade hospitalar, ou até mesmo entre unidades diferentes. Essa transmissão cruzada de microrganismos muitas vezes está relacionada a assistência à saúde, e ocorre através das mãos dos profissionais ou de dispositivos médicos. Esse fato é preocupante, pois a maioria desses microrganismos capazes de disseminar pelo ambiente hospitalar são virulentos, apresentam maior capacidade de permanência no ambiente e na maioria das vezes apresentam resistência aos antimicrobianos utilizados (KARAMI et al., 2019; SCHÄFER et al., 2019; FERREIRA et al., 2015; LUCENA et al., 2014).

Nesse contexto, é de extrema importância conhecer não só os mecanismos de resistência e de virulência desses microrganismos a fundo, como também a relação clonal entre isolados obtidos de diferentes pacientes e/ou locais de um mesmo hospital, como forma de conhecer e compreender a epidemiologia e as rotas das infecções em uma determinada unidade hospitalar, ou até mesmo no hospital como um todo, e traçar medidas de combate e controle de infecções cruzadas, ou até mesmo de surtos, desencadeados por microrganismos resistentes e virulentos (NEOH et al., 2019; DE LA ROSA-ZAMBONI et al., 2018; KEVAT et al., 2018). Para conhecer melhor esses microrganismos e estabelecer uma relação entre eles, técnicas que permitem a identificação de várias cepas de uma mesma espécie são empregadas (NEOH et al., 2019; SABAT et al., 2013).

A disseminação clonal de isolados de *P. aeruginosa* MDR é algo preocupante que é relatado em diversos países do mundo. Em um estudo de vigilância realizado no Estados Unidos envolvendo hospitais de várias regiões, encontraram uma porcentagem de *P. aeruginosa* resistente a carbapenêmicos próxima a 10%, e em apenas 2,3% desses isolados foram detectados genes codificadores de carbapenemases (WATERS et al., 2019). Já na Alemanha, um estudo multicêntrico analisou 62 isolados de *P. aeruginosa* recuperados de vários sítios

anatômicos, dos quais 21 foram produtores de carbapenemases, sendo encontrado gene *bla*_{VIM-2} em 17 isolados, *bla*_{VIM-1} em dois, *bla*_{IMP-82} e *bla*_{NDM-1/bla}_{GES-5} em um isolado cada. Os autores observaram também que grande parte desses isolados foram considerados MDR e acometeram principalmente pacientes admitidos em UTI, chamando atenção para a necessidade de controle de transmissão desse microrganismo em unidades críticas (SCHÄFER et al., 2019).

Já em um estudo epidemiológico envolvendo vários hospitais do Irã, verificou que a prevalência de *P. aeruginosa* produtoras de MBL foi de 32,4%, sendo os genes *bla*_{VIM} e *bla*_{IMP} os mais frequentes, correspondendo a 19 e 11%, respectivamente de todos os isolados MBL positivos (VAÉZ et al., 2018).

Gonçalves e colaboradores (2017) em um estudo realizado em um hospital universitário na região do Triângulo Mineiro, Minas Gerais, relataram que dos 157 isolados de *P. aeruginosa* recuperados de bacteremias, 43.9% apresentaram resistência a carbapenêmicos, dos quais 16,1% foram positivos para MBL, sendo que 10.7% expressaram o gene *bla*_{SPM} gene e 5.3% *bla*_{VIM}. Os autores também relataram como fatores de risco independentes para bacteremia por *P. aeruginosa* com este perfil, Terapia empírica inapropriada, uso de ventilação mecânica e sonda nasogástrica.

Ainda no Brasil, Quiles e colaboradores (2017) relataram um surto com elevada mortalidade por *P. aeruginosa* resistente a carbapenêmicos, produtora de MBL codificada por *bla*_{SPM-1} em um hospital de oncologia pediátrica no estado de São Paulo. Neste estudo, os pesquisadores observaram que todos os pacientes acometidos por este clone apresentavam estado crítico de saúde e eram neutropênicos. Além disso, todos os pacientes com bacteremia evoluíram para o óbito e a maioria apresentou choque séptico e síndrome respiratória aguda. Já em um estudo realizado no HC-UFU detectou que 87.5% dos isolados de *P. aeruginosa* recuperados de infecções nosocomiais apresentavam os genes *bla*_{SPM-1} e *bla*_{VIM} (ARAÚJO et al., 2016).

Apesar de vários estudos no Brasil descreverem a disseminação de clones predominantes em hospitais das diferentes regiões, ainda existem poucos dados e estudos multicêntricos bem delineados quanto a incidência de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos, bem como sua disseminação clonal e associado à evolução dos pacientes com bacteremia por esse microrganismo. Além disso, as consequências de infecções por *P. aeruginosa* resistentes podem ser fatais, especialmente para indivíduos imunocomprometidos, Desse modo, a realização de uma vigilância epidemiológica contínua dos pacientes que permita

conhecer o perfil dos isolados prevalentes tanto no hospital, aliada à manipulação adequada dos dispositivos invasivos, a execução correta de técnicas de higienização de mãos e objetos e ao uso racional de antimicrobianos, são fundamentais para minimizar ou até mesmo evitar os riscos de desenvolvimento de infecções invasivas por *P. aeruginosa*, contribuindo para a redução das taxas de morbimortalidade.

6 VIRULÊNCIA

Para que um processo infeccioso se instale é necessário um desequilíbrio na relação parasito-hospedeiro, e a expressão de fatores de virulência pelo microrganismo pode conferir ‘vantagens’ em relação ao hospedeiro, permitindo a instalação e/ou manutenção desse processo. Desse modo, é possível dizer que a patogenicidade do microrganismo está diretamente relacionada a sua habilidade de expressar esses fatores. No entanto, os tipos e intensidade de fatores de virulência varia de acordo com o microrganismo, com a resposta apresentada pelo hospedeiro e com o estágio da infecção.

Um dos principais fatores de virulência que tem sido cada vez mais estudado por pesquisadores no mundo todo em diversos microrganismos, inclusive *P. aeruginosa*, é a capacidade de formação de biofilme, o qual, além de permitir a manutenção da bactéria por mais tempo no ambiente, hospedeiro e/ou superfícies de equipamentos hospitalares e dispositivos médicos, também dificulta a ação dos mecanismos de defesa do hospedeiro, a remoção do microrganismos dessas superfícies por agentes biocidas e inibe a ação de diversos antimicrobianos. Isso, porque, o biofilme é formado por uma comunidade de células bacterianas aderidas a superfícies bióticas ou abióticas, embebidas por uma matriz polimérica composta por proteínas, polissacarídeos e ácidos nucleicos (COSTERTON, 1999).

Além do biofilme, isolados de *P. aeruginosa* também expressam outros fatores de virulência que podem ser estruturais ou produzidos e secretados para o meio externo ou diretamente no interior das células do hospedeiro. São considerados fatores de virulência estruturais: fimbrias ou *pilli*, estruturas presentes na superfície bacteriana e que permitem sua adesão ao epitélio do hospedeiro; flagelo, que confere motilidade à bactéria; cápsula de polissacarídeo, que permite a bactéria evadir da ação do sistema imunológico do hospedeiro; lipopolissacarídeo (LPS), responsável pelas manifestações sistêmicas do processo infeccioso, sendo encontrado na membrana bacteriana externa (PIMENTA, DI MARTINO e BLIGHT, 2006).

Dentre os fatores de virulência que podem ser produzidos e secretados para o meio, temos: pirocina, pioverdina, proteases, elastases, fosfolipases e exotoxinas, podendo essa última ser secretada de forma passiva pela célula, ou ativamente através de sistemas de secreção tipo I (T1SS), tipo II (T2SS), tipo III (T3SS), tipo V (T5SS) e tipo VI (T6SS), sendo II e III os sistemas responsáveis pela secreção de grande parte das toxinas descritas na literatura (BRADBURY et al, 2010; SAWA et al, 2014).

O sistema T2SS é responsável pela secreção para o meio extracelular de exotoxina A, responsável por processos necróticos e por inibir a biossíntese de proteínas na célula eucariótica. Este sistema também inclui a protease LasA, que atua de forma a deixar a elastina mais susceptível à clivagem pela LasB, a qual tem atividade proteolítica tanto sobre tecidos conectivos, quanto sobre moléculas do sistema imune (BRADBURY et al., 2010; NIKBIN et al., 2012).

O sistema de secreção tipo III constitui o grupo de exotoxinas mais estudado. Isso, porque, as toxinas secretadas por este sistema são lançadas diretamente no interior das células do hospedeiro, por intermédio de bombas de transporte presentes na membrana da célula bacteriana (TAKATA, YAMAGISHI, MIKAMO, 2018; EL-SOLH et al., 2012). Desse modo, esse sistema é considerado o fator de virulência mais efetivo de *P. aeruginosa* e está diretamente associado a processos infecciosos graves e com a piora da evolução clínica do paciente. Apesar dos genes que codificam a translocação do sistema T3SS estarem presentes em todas as cepas de *P. aeruginosa*, apenas um pequeno número é capaz de expressá-lo e secretar as proteínas efetoras (TAKATA, YAMAGISHI, MIKAMO, 2018; FELTMAN et al., 2001).

São quatro as proteínas efetoras que podem ser secretadas de forma variável pelo sistema T3SS: exoenzima S (ExoS), exoenzima T (ExoT), exoenzima U (ExoU) e exoenzima Y (ExoY), cuja liberação é ativada quando há o contato com a membrana de células eucarióticas, provocando interferência na tradução, morte celular e na resposta imune do hospedeiro (RUTHERFORD et al., 2018; TAKATA, YAMAGISHI, MIKAMO, 2018; GALLE, CARPENTIER e BEYAERT, 2012; BRADBURY et al, 2010; HAUSER, 2009). No entanto, secreção das quatro enzimas por um mesmo isolado é incomum (SUBEDI et al., 2018). Geralmente, os isolados clínicos de *P. aeruginosa* enquadram-se em um dos três fenótipos a seguir: a) aqueles que secretam exoU e exoT, b) aqueles que secretam exoS e exoT e c) aqueles que não secretam proteínas do sistema T3SS (ADITI et al., 2017).

ExoS e ExoT foram as primeiras exotoxinas identificadas, sendo estruturalmente similares e bifuncionais, já que apresentam dois domínios ativos, um (C-terminal) com atividade ADP-ribosiltransferase e outro (N-terminal) com função ativadora de RhoGTPase, que está diretamente relacionado com a regulação de inúmeras funções celulares, dentre as quais destaca-se a transcrição genética (MOON e ZHENG, 2003). Ambas atuam no citoesqueleto das células do hospedeiro, interferindo em fenômenos diversos, como a síntese de DNA. Apesar da alta similaridade, ExoT apresenta somente 0,2% da atividade de ExoS (SILVA, 2016).

Sabe-se que ExoS é a principal proteína relacionada ao processo de colonização, invasão e disseminação bacteriana durante a infecção (SAWA, 2014). Sua patogenicidade está relacionada a capacidade de romper a actina e causar rearranjos no citoesqueleto, culminado na redução da internalização bacteriana por células fagocíticas do hospedeiro (VANCE, RIETSCH e MEKALANOS, 2005). Já ExoT atua promovendo a redução da motilidade de macrófagos e a fagocitose, além de impedir a cicatrização de feridas (SAWA, 2014). No entanto, ainda é considerada a proteína com menor atividade de virulência (CHO et al, 2014).

ExoY é uma adenilato-ciclase que provoca redução de AMP-cíclico no citoplasma da célula eucariótica, levando à destruição da actina do citoesqueleto. Além disso, impede a internalização das células bacterianas pelos macrófagos e aumenta a permeabilidade endotelial, resultando na formação de edema (SAWA, 2014; PEREIRA, 2013). Apesar de ser relatada essa ação severa que exoY pode causar nas células do hospedeiro, exoY tem demonstrado menor efeito sobre a virulência de isolados de *P. aeruginosa*.

Exo U é uma fosfolipase com atividade citotóxica ágil e letal, devido a capacidade de provocar morte rápida das células nas quais é injetada ao promover a perda da integridade da membrana plasmática, compatível com necrose (SAWA et al., 2014). É uma exotoxina que possui inúmeros substratos, dentre eles: fosfolípidos, lisofosfolípidos e lípidos neutros (HAUSER, 2009). Sabe-se que ExoU é responsável por citotoxicidade aguda em células epiteliais e macrófagos (BOTELHO; GROSSO; PEIXE, 2018; KULASEKARA et al., 2006), como ainda por provocar destruição de neutrófilos no caso de doenças infecciosas graves, promovendo persistência e disseminação bacteriana (HAUSER, 2009; DIAZ et al., 2008). ExoU também exerce um considerável efeito pró-inflamatório e atividade pró-coagulante. A toxicidade de exoU chega a ser 100 vezes maior do que a observada em exoS, estando associada a choque séptico e a piora na evolução clínica do paciente (BOTELHO; GROSSO; PEIXE, 2018; BRADBURY et al., 2010; KULASEKARA et al., 2006).

Além da ação citotóxica, cepas de *P. aeruginosa* que expressam gene *exoU* apresentam maior resistência antimicrobiana, sendo menos susceptíveis a ação de cefepima, ceftazidima, piperacilina/tazobactam, carbapenêmicos e gentamicina (BOTELHO; GROSSO; PEIXE, 2018; SUBEDI et al., 2018; KULASEKARA et al., 2006). Além disso, abrigam mutações em *gyrA* e expressão aumentada de bombas de efluxo, culminando na resistência a fluoroquinolonas (SUBEDI et al., 2018; WONG-BERINGER et al., 2008). No entanto, a razão dessa relação ainda permanece desconhecida (SUBEDI et al., 2018; TAKATA; YAMAGISHI; MIKAMO, 2017).

Diante disso, observa-se que a capacidade de modular a resposta imunológica do hospedeiro, aliada à habilidade de provocar grandes danos teciduais justifica porque *ExoU* e *ExoS* desempenham papel importante na patogenicidade de isolados de *P. aeruginosa* (GALLE, CARPENTIER e BEYAERT, 2012).

ExoU e *exoS* são mutuamente exclusivas na maioria das cepas de *P. aeruginosa* e, apesar de estarem relacionadas uma maior virulência, a frequência que isolados que expressam *exoU* e *exoS* varia, dependendo do sítio de infecção e do histórico do paciente. Ao passo que *exoY* e *exoT*, mesmo não sendo tão impactantes na patogenicidade de *P. aeruginosa* são expressas na maioria das cepas (TAKATA; YAMAGISHI; MIKAMO, 2017). Pesquisas mostram que isolados com genótipo *exoS* +/*exoU*- apresentam fenótipo bastante invasivo, enquanto aqueles com genótipo *exoS*-/*exoU*+ estão relacionados a uma citotoxicidade celular elevada e frequentemente relacionados a processos infecciosos crônicos (DIAZ; HAUSER, 2010; JUAN; PENÃ; OLIVER, 2017).

Estudos mostram que a porcentagem de isolados de *P. aeruginosa* que expressão gene *exoS*, *exoT* e *exoY* é superior a 80%, sendo *exoU* encontrado numa frequência menor, variando de 10 a 20% dos isolados (KHODAYARY et al., 2019; TAKATA; YAMAGISHI; MIKAMO, 2018; FERREIRA et al., 2015). Vale destacar que esses autores encontraram uma expressão significativamente maior de *exoU* em isolados resistentes a carbapenêmicos, e que indivíduos com infecção por *P. aeruginosa* *exoU*+ apresentaram prognóstico pior, evoluindo para o óbito.

7 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR NA PREVENÇÃO E CONTROLE DE IRAS

As vantagens adaptativas observadas para os microrganismos, como a resistência aos antimicrobianos, a virulência e a produção de biofilme, estabelecem um quadro complexo no

controle e tratamento das IRAS (BOTELHO; GROSSO; PEIXE, et al., 2019; HORCAJADA et al., 2019). Como mencionado anteriormente, estudos multicêntricos fornecem dados alarmantes sobre essas infecções, principalmente em casos com pior prognóstico (sepse e pneumonia), particularmente em países como o Brasil, onde os recursos para a saúde são cada vez mais escassos (FORTALEZA et al., 2017; BRAGA et al., 2018) associados com a frequência elevada de fenótipos extremamente resistentes e um alto uso de antimicrobianos nos hospitais (BRAGA et al., 2018). Dessa forma, há um consenso dos profissionais e especialistas na área quanto à necessidade de tomada de ações estratégicas para a redução das IRAS (CHOU et al., 2020; BOTELHO; GROSSO; PEIXE, et al., 2019; HORCAJADA et al., 2019).

Em estudos envolvendo *P. aeruginosa* a detecção de genes de resistência e/ou virulência geralmente é feita utilizando a técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) convencional ou sua variante, a PCR em tempo real (qRT-PCR), sendo essa última mais empregada em estudos que pesquisam mecanismos que são relacionados ao aumento ou diminuição dos níveis de RNA mensageiros específicos. Os estudos envolvendo amostras de *P. aeruginosa* baseiam sua análise na comparação dos resultados dos genes expressos pelas cepas em análise com os da linhagem padrão de *P. aeruginosa* (PA01), possibilitando inferir quantitativamente a hiperprodução ou expressão reduzida de determinada proteína ou gene relacionado com a resistência e/ou virulência (XAVIER et al., 2010).

Estudos que visam estabelecer uma relação clonal entre cepas de *P. aeruginosa* de diferentes fontes (clínica e ambiental) e indivíduos e traçar possíveis rotas de infecção fazem uso de técnicas mais modernas como a Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) e do Polimorfismo no Tamanho dos Fragmentos de Restrição (RFLP); ou ainda de métodos baseados na amplificação de ácidos nucléicos pela PCR, como o Polimorfismo do DNA Amplificado Aleatoriamente (RAPD-PCR) e Tipagem de Sequência Multilocus (MLST) (GOMILA et al., 2013).

Técnicas moleculares tem sido cada vez mais empregadas em estudos epidemiológicos, sendo um aporte importante para nortear a adoção de medidas de controle de IRAS pelas equipes de saúde. Assim, a escolha da técnica a ser empregada depende do tipo de problema que o pesquisador pretende solucionar, do contexto epidemiológico, temporal e geográfico do estudo. Em pesquisas cujo objetivo é investigar surtos, a técnica escolhida deve ter um poder discriminatório que permita não só a distinção de todas as cepas não relacionadas do ponto de vista epidemiológico, como ainda detectar aquelas que são altamente similares, com intuito de revelar a transmissão cruzada do patógeno e possibilitar o desenvolvimento de estratégias de

controle e prevenção. Além disso, o pesquisador também deve levar em consideração o custo para execução da técnica, sua reprodutibilidade, facilidade de execução e interpretação dos resultados obtidos. Nesse contexto, em estudos epidemiológicos e de surtos causados por bactérias, a técnica PFGE é a mais empregada, sendo considerada o padrão ouro (NEOH et al., 2019; YU et al., 2012). Apesar de ser a técnica mais utilizada, o PFGE ainda é uma metodologia relativamente cara, principalmente para países em desenvolvimento, cujo protocolo de execução é longo, podendo levar vários dias para obtenção do resultado final, dependendo da espécie que está sendo analisada (NEOH et al., 2019).

Por outro lado, quando a tipagem molecular é realizada visando uma vigilância contínua, a escolha da técnica deve levar em consideração a capacidade de fornecer resultados estáveis ao longo do tempo, com intuito de permitir adoção de medidas eficazes no controle de infecções nosocomiais. Além disso, a metodologia deve permitir a criação de um banco de dados, que poderá ser utilizado em redes internacionais, produzir dados móveis que sejam facilmente transferidos entre sistemas operacionais diferentes e que possa ser acessado da forma mais fácil possível através de uma base de dados na internet (SABAT et al., 2013).

Nesse sentido, o MLST é a técnica mais utilizada, especialmente em estudos epidemiológicos, geográficos e de análise evolutiva de linhagens bacterianas. Através do MLST é possível discriminar isolados de *P. aeruginosa* por meio da análise das diferenças nas sequências de sete genes: *acsA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *nuoD*, *ppsA* e *trpE*, fornecendo uma base de dados que permite a comparação dos resultados obtidos (MAÂTALLAH et al., 2013; CURRAN et al., 2004). Além disso, é uma técnica fácil de ser padronizada, possui alto poder discriminatório e os resultados obtidos podem ser compartilhados.

Por ser uma técnica que fornece bons resultados em estudos locais, o PFGE tem sido empregado em vários estudos desenvolvidos em um único hospital que visam determinar a relação entre isolados obtidos, especialmente em unidades hospitalares que atendem pacientes críticos, a exemplo das UTI. Utilizando a técnica de PFGE, Quiles e colaboradores (2017) confirmaram um surto com alta taxa de mortalidade por *P. aeruginosa* resistente a carbapenêmicos, produtora de MBL e expressando gene *bla_{SPM1}*, em uma unidade pediátrica de um hospital oncológico no estado de São Paulo. Os pesquisadores relataram ainda que um dos clusteres identificados apresentava alta similaridade com um clone endêmico de SPM1 detectado anteriormente no mesmo hospital.

Já um estudo de vigilância molecular, utilizando a técnica PFGE, realizado em três hospitais na Alemanha encontrou 13 isolados de *P. aeruginosa* produtora de carbapenemase com alta similaridade, sendo confirmado três casos de transmissão cruzada entre pacientes de UTI e um caso de transmissão ambiente para paciente (SCHÄFER et al., 2019).

No Clinical Hospital da Universidade Federal de Uberlândia, um estudo realizado entre 2009 e 2012 observou a disseminação policlonal de amostras de *P. aeruginosa* MDR contendo gene *bla_{VIM}* em duas enfermarias distintas. Além disso, utilizando a técnica de PFGE foi possível detectar a disseminação de um único clone de *P. aeruginosa* na UTI e enfermarias cirúrgicas (DANTAS, 2015).

Esses achados permitem conhecer a epidemiologia de infecções bacterianas nos hospitais ao longo do tempo e como se dá a disseminação de clones resistentes entre as unidades hospitalares e pacientes, possibilitando descobrir quais perfis são endêmicos em cada hospital para traçar medidas de controle e até mesmo terapêuticas (NEOH et al., 2019).

Atualmente, as amostras de *P. aeruginosa* isoladas no HC-UFU apresentam índices de resistência aos carbapenêmicos bastante elevados, sendo associados a mortalidade expressiva, sendo assim faz-se necessários trabalhos que envolvam estudos capazes de esclarecer a importância dos fatores de virulência, resistência bem como a terapia inadequada associados com mortalidade no país.

REFERÊNCIAS

ADITI; SHARIFF, M.; CHHABRA, S.K.; RAHMAN, M.U. Similar virulence properties of infection and colonization associated *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol*, London, v. 66, n. 10, p. 1489-1498, out. 2017. doi: 10.1099/jmm.0.000569.

<https://doi.org/10.1099/jmm.0.000569>

PMid:28893354

ALLEGIANZI, B.; BAGHERI NEJAD, S.; 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*, London, v. 377, n. 9761, p. 228-241, 2011. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61458-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61458-4)

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61458-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61458-4)

ALP, E.; DAMANI, N. Healthcare-associated infections in intensive care units: epidemiology and infection control in low-to-middle income countries. *J Infect Dev Ctries*, Itália, v. 9, n. 10, p. 1040-1045, out. 2015. <https://doi.org/10.3855/jidc.6832>.

<https://doi.org/10.3855/jidc.6832>

PMid:26517477

AMBLER, R.P. The structure of β -lactamase. *Phil Trans R Soc Lond B Sci*, London, v. 289, n. 36, p. 321-331, 1980.

<https://doi.org/10.1098/rstb.1980.0049>

PMid:6109327

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Medidas de Prevenção de Infecção Relacionada a 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 a Assistência à Saúde. Módulo 2, Série Controle Externo da Qualidade, Brasília, 2013b.

ARABI, Y.; AL-SHIRAWI, N.; MEMISH, Z.; ANZUETO, A. Ventilator-associated pneumonia in adults in developing countries: a systematic review. *Int J Infect Dis*, v. 12, n. 5, p. 505-12, set. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2008.02.010>

<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2008.02.010>

PMid:18502674

ARAÚJO, B.F.; FERREIRA, M.L.; CAMPOS, P.A.; ROYER, S.; BATISTÃO, D.W.; DANTAS, R.C.; GONÇALVES, I.R.; FARIA, A.L.; BRITO, C.S.; YOKOSAWA, J.; GONTIJO-FILHO, P.P.; RIBAS, R.M. Clinical and Molecular Epidemiology of Multidrug-Resistant *P. aeruginosa* Carrying *aac(6)-Ib-cr*, *qnrS1* and *blaSPM* Genes in Brazil. *PLoS One*, San Francisco, v. 11, n. 5, p. e0155914, maio 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0155914.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155914>

PMid:27219003 PMCID:PMC4878783

ASKOURA, M.; MOTTAWEA, W.; ABUJAMEL, T.; TAHER, I. Efflux pump inhibitors (EPIs) as new antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*. *Libyan J Med*, Philadelphia, v. 13, maio 2011. doi: 10.3402/ljm.v6i0.5870.

<https://doi.org/10.3402/ljm.v6i0.5870>

PMid:21594004 PMCID:PMC3096568

BALKHAIR, A.; AL-MUHARRMI, Z.; AL'ADAWI, B.; AL BUSAIDI, I.; TAHER, H.B.; AL-SIYABI, T.; AL AMIN, M.; HASSAN, K.S. Prevalence and 30-day all-cause mortality of carbapenem-and colistin-resistant bacteraemia caused by *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella pneumoniae*: description of a decade-long trend. *Int J Infect Dis*, Hamilton, v. 85, p. 10-15, ago. 2019. doi: 10.1016/j.ijid.2019.05.004.

<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.05.004>

PMid:31100418

BARSANTI, M.C.; WOELTJE, K.F. Infection prevention in the intensive care unit. *Infect Dis Clin North Am*, Philadelphia, v. 23, n. 3, p. 703-725, set. 2009. doi: 10.1016/j.idc.2009.04.012.

<https://doi.org/10.1016/j.idc.2009.04.012>

PMid:19665091

BASSETTI, M.; VENA, A.; CROXATTO, A.; RIGHI, E.; GUERY, B. How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs Context*, London, v. 7, p. 212527, maio 2018. doi: <https://doi.org/10.7573/dic.212527>.

<https://doi.org/10.7573/dic.212527>

PMid:29872449 PMCID:PMC5978525

BOGAN, C.; KAYE, K.S.; CHOPRA, T.; HAYAKAWA, K.; POGUE, J.M.; LEPHART, P.R.; BHEEMREDDY, S.; LAZAROVITCH, T.; ZAIDENSTEIN, R.; PEREZ, F.; BONOMO, R.A.; MARCHAIM, D. Outcomes of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae isolation: matched analysis. *Am J Infect Control*, St. Louis, v. 42, n. 6, p. 612-620, jun 2014. doi: 10.1016/j.ajic.2014.02.013.

<https://doi.org/10.1016/j.ajic.2014.02.013>

PMid:24837111

BONOMO, R.A.; BURD, E.M.; CONLY, J.; LIMBAGO, B.M.; POIREL, L.; SEGRE, J.A.; WESTBLADE, L.F. Carbapenemase-producing organisms: a global scourge. *Clin Infect Dis*, Chicago, v. 66, n. 8, p. 1290-1297, abr. 2018. doi: 10.1093/cid/cix893.

<https://doi.org/10.1093/cid/cix893>

PMid:29165604 PMCID:PMC5884739

BOSZCZOWSKI, I.; SALOMÃO, M.C.; MOURA, M.L.; FREIRE, M.P.; GUIMARÃES, T.; CURY, A.P.; ROSSI, F.; RIZEK, C.F.; MARTINS, R.; COSTA, S.F. Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*: genetic diversity, mechanisms of resistance to polymyxins and clinical outcomes in a tertiary teaching hospital in Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, São Paulo, v. 61, p. e29, 2019. doi:10.1590/S1678-9946201961029.

<https://doi.org/10.1590/s1678-9946201961029>

PMid:31241658 PMCID:PMC6592011

BOTELHO, J. GROSSO, F.; PEIXE, L. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* - Mechanisms, epidemiology and evolution. *Drug Resist Updat*, Philadelphia, v. 44, p. 100640, maio 2019. doi: 10.1016/j.drug.2019.07.002.

<https://doi.org/10.1016/j.drug.2019.07.002>

PMid:31492517

BOTELHO, J.; GROSSO, F.; PEIXE, L. Unravelling the genome of a *Pseudomonas aeruginosa* isolate belonging to the high-risk clone ST235 reveals an integrative conjugative element housing a blaGES-6 carbapenemase. *J Antimicrob Chemother*, London, v. 73, n. 1, p. 77-83, jan. 2018. doi: <https://doi.org/10.1093/jac/dkx337>.

<https://doi.org/10.1093/jac/dkx337>

PMid:29029083

BOUCHER, H.W.; TALBOT, G.H.; BRADLEY, J.S.; EDWARDS, J.E.; GILBERT, D.; RICE, L.B.; SCHELD, M.; SPELLBERG, B.; BARTLETT, J. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*, Chicago, v. 48, n. 1, p. 1-12, jan. 2009. doi: 10.1086/595011.

<https://doi.org/10.1086/595011>

PMid:19035777

BRAGA, I.A.; CAMPOS, P.A.; GONTIJO-FILHO, P.P.; RIBAS, R.M. Multi-hospital point prevalence study of healthcare-associated infections in 28 adult intensive care units in Brazil. *J Hosp Infect*, New York, v. 99, n. 3, p. 318-324, jul. 2018. doi: 10.1016/j.jhin.2018.03.003.

<https://doi.org/10.1016/j.jhin.2018.03.003>

PMid:29522784

BRADBURY, R.S.; RODDAM, L.F.; MERRIT, A.; REID, D.W.; CHAMPOIN, A.C. Virulence gene distribution in clinical, nosocomial and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol*, London, v.59, n. 8, p.881-890, ago. 2010. doi: 10.1099/jmm.0.018283-0.

<https://doi.org/10.1099/jmm.0.018283-0>

PMid:20430902

BUSH, K. New β -lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis*, Chicago, v. 32, n. 7, p.1085-1089, abr. 2001. doi: 10.1086/319610.

<https://doi.org/10.1086/319610>

PMid:11264037

CANTÓN, R., RUIZ-GARBAJOSA, P. Co-resistance: an opportunity for the bacteria and resistance genes. *Curr Opin Pharmacol*, Oxford, v. 11, n. 5, p. 477-485, out. 2011. doi: <https://doi.org/10.1016/J.COPH.2011.07.007>.

<https://doi.org/10.1016/j.coph.2011.07.007>

PMid:21840259

CENTRE FOR DISEASE PREVENTION CONTROL (CDC). Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. Atlanta, 2013.

CHANG, H.L.; TANG, C.H.; HSU, Y.M.; WAN, L.; CHANG, Y.F.; LIN, C.T.; TSENG, Y.R.; LIN, Y.J.; SHEU, J.J.; LIN, C.W.; CHANG, Y.C.; HO, M.W.; LIN, C.D.; HO, C.M.; LAI, C.H. Nosocomial outbreak of infection with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a medical center in Taiwan. *Infect Control Hosp Epidemiol*, Cambridge, v. 30, n. 1, p. 34-38, jan. 2009. doi: 10.1086/592704.

<https://doi.org/10.1086/592704>

PMid:19049437

CHAN, J. D.; GRAVES, J. A.; DELLIT, T. H. Antimicrobial treatment and clinical outcomes of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia. *J Int Care Med*, v. 25, n. 6, p. 343-8, 13 nov 2010.

<https://doi.org/10.1177/0885066610377975>

<https://doi.org/10.1177/0885066610377975>

PMid:20837632

CHEVALIER, S.; BOUFFARTIGUES, E.; BODILIS, J.; MAILLOT, O.; LESOUHAITIER, O.; FEUILLOLEY, M.G.J.; ORANGE, N.; DUFOUR, A.; CORNELIS, P. Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins. *FEMS Microbiol Rev*, Amsterdam, v. 41, n. 5, p. 698-722, set. 2017. doi: <https://doi.org/10.1093/femsre/fux020>.

<https://doi.org/10.1093/femsre/fux020>

PMid:28981745

CHO, H.H.; KWON, K.C.; KIM, S.; KOO, S.H. Correlation between virulence genotype and fluoroquinolone resistance in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Ann Lab Med*, Seoul, v.34, n.4, p. 286-292, jul. 2014. doi: 10.3343/alm.2014.34.4.286.

<https://doi.org/10.3343/alm.2014.34.4.286>

PMid:24982833 PMCID:PMC4071185

CHOU, C.H.; LAI, Y.R.; CHI, C.Y.; HO, M.W.; CHEN, C.L.; LIAO, W.C.; HO, C.M.; CHEN, Y.A.; CHEN, C.Y.; LIN, Y.T.; LIN, C.D.; LAI, C.H. Long-term surveillance of antibiotic prescriptions and the prevalence of antimicrobial resistance in non-fermenting Gram-Negative Bacilli. *Microorganisms*, Suíça, v. 8, n. 3, p. E397, mar. 2020. doi: 10.3390/microorganisms8030397.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms8030397>

PMid:32178340 PMCID:PMC7142802

CORNAGLIA, G.; GIAMARELLOU, H.; ROSSOLINI, G.M. Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams? *Lancet Infect Dis*, New York, v. 11, p. 381-393, maio 2011. doi: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70056-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70056-1).

[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70056-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70056-1)

CORNEJO-JUÁREZ, P.; VILAR-COMPTE, D.; PÉREZ-JIMÉNEZ, C.; ÑAMENDYS-SILVA, S.A.; SANDOVAL-HERNÁNDEZ, S.; VOLKOW-FERNÁNDEZ, P. The impact of hospital-acquired infections with multidrug-resistant bacteria in an oncology intensive

care unit. *Inter J Infect Dis*, v. 31, p. 31-34, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2014.12.022>
<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2014.12.022>
PMid:25528484

CORREA, A.; MONTEALEGRE, M.C.; MOJICA, M.F.; MAYA, J.J.; ROJAS, L.J.; DE LA CADENA, E.P.; RUIZ, S.J.; RECALDE, M.; ROSSO, F.; QUINN, J.P.; VILLEGAS, M.V. First report of a *Pseudomonas aeruginosa* isolate co-harboring KPC and VIM carbapenemases. *Antimicrob Agents Chemother*, Washington, v.56, n. 10, p. 5422-5423, out. 2012. doi: 10.1128/AAC.00695-12.
<https://doi.org/10.1128/AAC.00695-12>
PMid:22825120 PMCID:PMC3457400

COSTERTON, J.W.; STEWART, P.S.; GREENBERG, E.P. Bacterial Biofilms: A common cause of persistent infections. *Science*, New York, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, maio 1999. doi: 10.1126/science.284.5418.1318.
<https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>
PMid:10334980

CURRAN, B.; JONAS, D.; GRUNDMANN, H.; PITT, T.; DOWSON, C. G. Development of a Multilocus Sequence Typing scheme for the opportunist pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol*, Washington, v.42, n. 12, p.5644-5649, dez. 2004. doi: 10.1128/JCM.42.12.5644-5649.2004.
<https://doi.org/10.1128/JCM.42.12.5644-5649.2004>
PMid:15583294 PMCID:PMC535286

DAGA, A.P.; KOGA, V.L.; SONCINI, J.G.M.; DE MATOS, C.M.; PERUGINI, M.R.E.; PELISSON, M.; KOBAYASHI, R.K.T.; VESPERO, E.C. *Escherichia coli* Bloodstream Infections in Patients at a University Hospital: Virulence Factors and Clinical Characteristics. *Front Cell Infect Microbiol*, v. 9, p. 191, Jun 2019. doi: 10.3389/fcimb.2019.00191.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00191>
PMid:31245301 PMCID:PMC6563721

DANTAS, R.C.C. Estudo epidemiológico molecular da resistência aos carbapenêmicos em *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de sangue: produção de β -lactamases, perda de porina OprD e hiperexpressão de bombas de efluxo. 2015. Tese de Doutorado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015.

DANTAS, R. C.; FERREIRA, M. L.; GONTIJO-FILHO, P. P.; RIBAS, R. M. *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia: independent risk factors for mortality and impact of resistance on outcome. *J Med Microbiol*, London, v. 63, n. 12, p.1679-1687, dez. 2014. doi: 10.1099/jmm.0.073262-0.
<https://doi.org/10.1099/jmm.0.073262-0>
PMid:25261066

DANTAS, R.C.C.; SILVA, R.T.E.; FERREIRA, M.L.; GONÇALVES, I.R.; ARAÚJO, B.F.; CAMPOS, P.A.; ROYER, S.; BATISTÃO, D.W.D.F.; GONTIJO-FILHO, P.P.; RIBAS, R.M. Molecular epidemiological survey of bacteremia by multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*: the relevance of intrinsic resistance mechanisms. *PLoS One*, San Francisco, v. 12, n. 5, p. e0176774, maio 2017. doi: 10.1371/journal.pone.0176774.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176774>
 PMid:28481953 PMCID:PMC5421754

DENIS, J.B.; LEHINGUE, S.; PAULY, V.; CASSIR, N.; GAINNIER, M.; LÉONE, M.; DAVIET, F.; COIFFARD, B.; BARON, S.; GUERVILLY, C.; FOREL, J.M.; ROCH, A.; PAPAZIAN, L. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and mortality in mechanically ventilated ICU patients. *Am J Infect Control*, v. 47, n. 9, p. 1059-1064, set. 2019. doi: 10.1016/j.ajic.2019.02.030.
<https://doi.org/10.1016/j.ajic.2019.02.030>
 PMid:30962023

DE LA ROSA-ZAMBONI, D.; OCHOA-, S.A.; LARIS-GONZÁLEZ, A.; CRUZ-CÓRDOVA, A.; ESCALONA-VENEGAS, G.; PÉREZ-AVENDAÑO, G.; TORRES-GARCÍA, M.; SUARÉZ-MORA, R.; CASTELLANOS-CRUZ, C.; SÁNCHEZ-FLORES, Y.V.; VÁZQUEZ-FLORES, A.; ÁGUILA-TORRES, R.; PARRA-ORTEGA, I.; KLÜNDER-KLÜNDER, M.; ARELLANO-GALINDO, J.; HERNÁNDEZ-CASTRO, R.; XICOHTENCATL-CORTES, J. Everybody hands-on to avoid ESKAPE: effect of sustained hand hygiene compliance on healthcare-associated infections and multidrug resistance in a paediatric hospital. *J Med Microbiol*, London, v. 67, n. 12, p. 1761-1771, dez. 2018, doi: 10.1099/jmm.0.000863.
<https://doi.org/10.1099/jmm.0.000863>
 PMid:30372411

DIAS, V.L. Infecções de corrente sanguínea por Bacilos Gram negativos multirresistentes em UTI de adultos mista de um Hospital Terciário de Ensino no Brasil. 2019. Dissertação de Mestrado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019.

DIAS, V.C.; RESENDE, J.A.; BASTOS, A.N.; BASTOS, L.Q.A.; BASTOS, V.Q.A.; BASTOS, R.V.; DINIZ, C.G.; DA SILVA, V.L. Epidemiological, physiological, and molecular characteristics of a brazilian collection of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Drug Resist*, New York, v. 23, n. 7, p. 852-863, out 2017. doi: 10.1089/mdr.2016.0219.
<https://doi.org/10.1089/mdr.2016.0219>
 PMid:28437232

DIAZ, M.H.; HAUSER, A.R. *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoU is injected into phagocytic cells during acute pneumonia. *Infect Immun*, Washington, v. 78, n. 4, p. 1447-1456, abr. 2010. doi: <https://doi.org/10.1128/IAI.01134-09>.
<https://doi.org/10.1128/IAI.01134-09>
 PMid:20100855 PMCID:PMC2849415

DIAZ, M.H.; SHAVER, C.M.; KING, J.D.; MUSUNURI, S.; KAZAZ, J.A.; HAUSER, A.R. *Pseudomonas aeruginosa* induces localized immunosuppression during pneumonia. *Infect Immun*, Washington, v. 76, n. 10, p. 4414-4421, out. 2008. doi: 10.1128/IAI.00012-08.

<https://doi.org/10.1128/IAI.00012-08>

PMid:18663007 PMCID:PMC2546837

DORON, M.D.S.; LISA, E.; DAVIDSON, M.D. Antimicrobial Stewardship. *Mayo Clinic Proceedings*, v. 86, n. 11, p. 1113-1123, nov. 2011. doi:

<https://doi.org/10.4065/mcp.2011.0358>.

<https://doi.org/10.4065/mcp.2011.0358>

PMid:22033257 PMCID:PMC3203003

DORTET, L.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Rapid identification of carbapenemase types in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp. by using a biochemical test. *Antimicrob Agents Chemother*, Washington, v. 56, n. 12, p. 6437-6440 dez. 2012. doi:

<https://doi.org/10.1128/AAC.01395-12>.

<https://doi.org/10.1128/AAC.01395-12>

PMid:23070158 PMCID:PMC3497194

DUDECK, M.A.; HORAN, T.C.; PETERSON, K.D.; ALLEN-BRIDSON, K.; MORRELL, G.; ANTTILA, A.; POLLOCK, D.A.; EDWARDS, J.R. National healthcare safety network report, data summary for 2011, device-associated module. *Am J Infect Control*, v. 41, p. 286-300, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.ajic.2013.01.002>

PMid:23538117 PMCID:PMC4625764

DUMAS, J.; VAN DELDEN, C.; PERRON, K; KÖHLER, T. Analysis of antibiotic resistance gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* by quantitative real-time PCR. *FEMS Microbiol Lett*, Oxford, v.254, n. 2, p.217-225, jan. 2006. doi: 10.1111/j.1574-6968.2005.00008.x.

<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2005.00008.x>

PMid:16445748

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION CONTROL (ECDC), 2013. Point prevalence survey reports: European long-term care facilities. Disponível em:

<https://ecdc.europa.eu/en/infectious-diseases-public-health/healthcare-associated-infections-long-term-care-facilities-0>. Acesso em 12 abril 2020.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION CONTROL (ECDC), 2014. Point prevalence survey report: Acute care hospitals. Disponível em:

<https://ecdc.europa.eu/en/healthcare-associated-infections-acute-care-hospitals/surveillance-disease-data/report>. Acesso em 12 abril 2020.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION CONTROL (ECDC).

Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2015. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net), 2015.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (ECDC), 2018. Healthcare-associated Infections Acquired in Intensive Care Units - Annual Epidemiological Report for 2016. Disponível em: <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/healthcare-associatedinfections-intensive-care-units-annual-epidemiological-0>. Acesso em 12 abril 2020.

EL SALABI, A.; BORRA, P.S.; TOLEMAN, M.A.; SAMUELSEN, Ø.; WALSH, T.R. Genetic and biochemical characterization of a novel Metallo-β-Lactamase, TMB-1, from an *Achromobacter xylosoxidans* strain isolated in Tripoli, Libya. *Antimicrob Agents Chemother*, Washington, v. 56, n. 5, p. 2241-2245, maio 2012. doi: 10.1128/AAC.05640-11.
<https://doi.org/10.1128/AAC.05640-11>
PMid:22290947 PMCID:PMC3346670

EL-SOLH, A.A.; HATTEMER, A.; HAUSER, A.R.; ALHAJHUSAIN, A.; VORA, H. Clinical outcomes of type III *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. *Crit Care Med*, Philadelphia, v. 40, n. 4, p.1157-1163, abr. 2012. doi: 10.1097/CCM.0b013e3182377906.
<https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3182377906>
PMid:22080633 PMCID:PMC3288436

FARSHADZADEH, Z.; KHOSRAVI, A.D.; ALAVI, S.M.; PARHIZQARI, N.; HOVEIZAVI, H. Spread of extended-spectrum β-lactamase genes of blaOXA-10, blaPER-1 and blaCTX-M in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients. *Burns*, Amsterdam, v.40, n. 8, p.1575-1580, abr. 2014. doi: 10.1016/j.burns.2014.02.008.
<https://doi.org/10.1016/j.burns.2014.02.008>
PMid:24767142

FELTMAN, H.; SCHULERT, G.; KHAN, S.; JAIN, M.; PETERSON, L.; HAUSER, A.R. Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, London, v.147, n. 10, p.2659-2669, out. 2001. doi: 10.1099/00221287-147-10-2659.
<https://doi.org/10.1099/00221287-147-10-2659>
PMid:11577145

FERREIRA, M.L.; DANTAS, R.C.; FARIA, A.L.S.; GONCALVES, I.R.; SILVEIRA DE BRITO, C.; 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*. *J Med Microbiol*, London, v. 64, n. 3, p. 262-271, mar 2015. doi: 10.1099/jmm.0.000023.
<https://doi.org/10.1099/jmm.0.000023>
PMid:25596115

FORTALEZA, C.; PADOVEZE, M.C.; KIFFER, C.; BARTH, A.L.; CARNEIRO, I.; GIAMBERARDINO, H.; RODRIGUES, J.; SANTOS FILHO, L.; DE MELLO, M.; PEREIRA, M.S.; GONTIJO FILHO, P.P.; ROCHA, M.; SERVOLO DE MEDEIROS, E.A.; PIGNATARI, A. Multi-state survey of healthcare-associated infections in acute care hospitals in Brazil. *J Hosp Infect*, New York, v. 96, n. 2, p. 139-144, 2017. Doi:

<https://doi.org/10.1016/j.jhin.2017.03.024>
<https://doi.org/10.1016/j.jhin.2017.03.024>
 PMid:28433398

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). *Diagn Microbiol Infect Dis*, New York, v. 73, n. 4, p. 354-360, ago. 2012. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2012.04.007. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.04.007>
 PMid:22656912

GALLE, M.; CARPENTIER, I.; BEYAERT, R. Structure and function of the type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr Protein Pept Sci*, United Arab Emirates, v.13, n. 8, p. 831-842, dez. 2012. doi: 10.2174/138920312804871210. <https://doi.org/10.2174/138920312804871210>
 PMid:23305368 PMCID:PMC3706959

GARCIA-VIDAL, C.; CARDOZO-ESPINOLA, C.; PUERTA-ALCALDE, P.; MARCO, F.; TELLEZ, A.; AGÜERO, D.; ROMERO-SANTANA, F.; DÍAZ-BEYÁ, M.; GINÉ, E.; MORATA, L.; RODRÍGUEZ-NÚÑEZ, O.; MARTINEZ, J.A.; MENSA, J.; ESTEVE, J.; SORIANO, A. Risk factors for mortality in patients with acute leukemia and bloodstream infections in the era of multiresistance. *PLoS One*, v. 13, n. 6, p. e0199531, 2018. doi:10.1371/journal.pone.0199531. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199531>
 PMid:29953464 PMCID:PMC6023133

GELLATLY, S.L.; HANCOCK, R.E.W. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog Dis*, Oxford, v. 67, n. 3, p. 159-173, abr. 2013. doi: <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12033>. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12033>

GOMILA, M.; GALLEGOS, M. C.; FERNÁNDEZ-BACA, V.; PAREJA, A.; PASCUAL, M.; DÍAZ-ANTOLIN, P.; GARCIA-VALDÉS, E.; LALUCAT, J. Genetic diversity of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a public hospital in Spain. *BMC Microbiol*, London, v.13, p. 138, jun. 2013. doi: 10.1186/1471-2180-13-138. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-138>

GONÇALVES, I.R.; DANTAS, R.C.C.; FERREIRA, M.L.; BATISTÃO, D.W.D.F.; GONTIJO-FILHO, P.P.; RIBAS, R.M. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: association with virulence genes and biofilm formation. *Braz J Microbiol*, Rio de Janeiro, v. 48, n. 2, p. 211-217, abr./jun. 2017. doi: 10.1016/j.bjm.2016.11.004. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.11.004>

GUÉNARD, S.; MULLER, C.; MONLEZUN, L.; BENAS, P.; BROUTIN, I.; JEANNOT, K.; PLÉSIAT, P. 2014. Multiple mutations lead to MexXY-OprM-dependent aminoglycoside resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, Washington, v. 58, n. 1, p. 221-228, 2014. doi: <https://doi.org/10.1128/>

AAC.01252-13.

<https://doi.org/10.1128/AAC.01252-13>

HAUSER, A.R. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat Rev Microbiol*, London, v. 7, n. 9, p. 654-665, set. 2009. doi: 10.1038/nrmicro2199.

<https://doi.org/10.1038/nrmicro2199>

HOPKINS, K.L.; FINDLAY, J.; MUSTAFA, N.; PIKE, R.; PARSONS, H.; WRIGHT, L.; WOODFORD, N.; MEUNIER, D. SPM-1 metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST277 in the UK. *J Med Microbiol*, London, v. 65, n. 7, p. 696-697, jul 2016. doi: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000269>.

<https://doi.org/10.1099/jmm.0.000269>

HORCAJADA, J.P.; MONTERO, M.; OLIVER, A.; SORLÍ, L.; LUQUE, S.; GÓMEZ-ZORRILLA, S.; BENITO, N.; GRAU, S. Epidemiology and treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Clin Microbiol Rev*, Washington, v. 32, n. 4, p. e00031-19, ago. 2019. doi: 10.1128/CMR.00031-19.

<https://doi.org/10.1128/CMR.00031-19>

JOSEPH, N. M.; SISTLA, S.; DUTTA, T. K.; BEADHE, A. S.; PARIJA, S.C. Ventilator-associated pneumonia: role of colonizers and value of routine endotracheal aspirate cultures. *Int J Infect Dis*, Hamilton, v. 14, n. 8, p. 723-729, ago. 2010. doi: 10.1016/j.ijid.2010.02.2248.

<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2010.02.2248>

JUAN, C.; PEÑA, C.; OLIVER, A. Host and pathogen biomarkers for severe *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Infect Dis*, Chicago, v. 215, n. 1, p. S44-S51, fev. 2017. doi: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw299>.

<https://doi.org/10.1093/infdis/jiw299>

KARAMI, P.; MOHAJERI, P.; YOUSEFI MASHOUF, R.; KARAMI, M.; YAGHOUBI, M.H.; DASTAN, D.; ALIKHANI, M.Y. Molecular characterization of clinical and environmental *Pseudomonas aeruginosa* isolated in a burn center. *Saudi J Biol Sci*, Arábia Saudita, v. 26, n. 7, p. 1731-1736, nov. 2019. doi: 10.1016/j.sjbs.2018.07.009.

<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.07.009>

KAYE, K.S.; MARCHAIM, D.; SMIALOWICZ, C.; BENTLEY, L. Suction regulators: a potential vector for hospital-acquired pathogens. *Infect Control Hosp Epidemiol*, Cambridge, v. 31, n. 7, p. 772-774, jul. 2010. doi: 10.1086/653820.

<https://doi.org/10.1086/653820>

KEVAT, A.; CARZINO, R.; MASSIE, J.; HARRISON, J.; GRIFFITHS, A.L. Elimination of Australian epidemic strain (AES1) *Pseudomonas aeruginosa* in a pediatric cystic fibrosis center. *Pediatr Pulmonol*, Philadelphia, v. 53, n. 11, p. 1498-1503, out. 2018. doi: 10.1002/ppul.24173.

<https://doi.org/10.1002/ppul.24173>

KHODAYARY, NIKOKAR, I.; MOBAYEN, M.R.; AFRASIABI, F.; ARAGHIAN, A.; ELMI, A.; MORADZADEH, M. High incidence of type III secretion system associated virulence factors (exoenzymes) in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Iranian burn patients. *BMC Res Notes*, London, v. 12, n. 1, p. 28, jan. 2019. doi: 10.1186/s13104-019-4071-0.

<https://doi.org/10.1186/s13104-019-4071-0>

KIM, Y.J.; JUN, Y.H.; KIM, Y.R.; PARK, K.G.; PARK, Y.J.; KANG, J.Y.; KIM, S.I. Risk factors for mortality in patients with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia; retrospective study of impact of combination antimicrobial therapy. *BMC Infect Dis*, London, v. 14, p. 161, mar. 2014. doi: 10.1186/1471-2334-14-161.

<https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-161>

KOLLEF, M.H. What is ventilator-associated pneumonia and why is it important? *Respir Care*, Philadelphia, v. 50, n. 6, p. 714-721, jun 2005.

KOSMIDIS, C.I.; CHANDRASEKAR, P.H. Management of gram-positive bacterial infections in patients with cancer. *Leuk Lymphoma*, New York, v. 53, n. 1, p. 8-18, jan. 2012. doi: 10.3109/10428194.2011.602770.

<https://doi.org/10.3109/10428194.2011.602770>

KOULENTI, D.; TSIGOU, E.; RELLO, J. Nosocomial pneumonia in 27 ICUs in Europe: perspectives from the EU-VAP/CAP study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, v. 36, n. 11, p. 1999-2006, nov 2017. doi: 10.1007/s10096-016-2703-z. Epub 2016 Jun 10. PMID: 27287765.

<https://doi.org/10.1007/s10096-016-2703-z>

KULASEKARA, B.R.; KULASEKARA, H.D.; WOLFGANG, M.C.; STEVENS, L.; FRANK, D.W.; LORY, S. Acquisition and evolution of the *exoU* locus in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, Washington, v. 188, n. 1, p. 4037-4050, jun. 2006. doi: <https://doi.org/10.1128/JB.02000-05>.

<https://doi.org/10.1128/JB.02000-05>

LABARCA, J.A.; SALLES, M.J.; SEAS, C.; GUZMÁN-BLANCO, M. Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in the nosocomial setting in Latin America. *Crit Rev Microbiol*, London, v. 42, n. 2, p. 276-292, 2016;42(2):276-92. doi: 10.3109/1040841X.2014.940494.

<https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.940494>

LAUPLAND, K.B.; PASQUILL, K.; DAGASSO, G.; PARFITT, E.C.; STEELE, L.; SCHONHEYDER, H.C. Population-based risk factors for community-onset bloodstream infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, Berlin, v. 39, n. 4, p. 753-758, abr. 2020. doi: 10.1007/s10096-019-03777-8.

<https://doi.org/10.1007/s10096-019-03777-8>

LEAL, H.F.; AZEVEDO, J.; SILVA, G.E.O.; AMORIM, A.M.L.; DE ROMA, L.R.C.; ARRAES, A.C.P.; GOUVEIA, E.L.; REIS, M.G.; MENDES, A.V.; DE OLIVEIRA SILVA, M.; BARBERINO, M.G.; MARTINS, I.S.; REIS, J.N. Bloodstream infections caused by multidrug-resistant gram-negative bacteria: epidemiological, clinical and microbiological features. *BMC Infect Dis*, v. 19, n. 1, p. 609, jul 2019. doi: 10.1186/s12879-019-4265-z.
<https://doi.org/10.1186/s12879-019-4265-z>

LEYLABADLO, H.E.; POURLAK, T.; BIALVAEI, A.Z.; AGHAZADEH, M.; ASGHARZADEH, M.; KAFIL, H.S. Extended-Spectrum Beta-lactamase producing gram negative bacteria in Iran: a review. *Afr J Infect Dis*, v. 11, n. 2, p. 39-53, jul 2017.
<https://doi.org/10.21010/ajid.v11i2.6>
<https://doi.org/10.21010/ajid.v11i2.6>

LI, X.Z.; PLÉSIAT, P.; NIKAIDO, H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Rev*, Washington, v. 28, n. 2, p. 337-418, abr. 2015. doi: <https://doi.org/10.1128/CMR.00117-14>.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00117-14>

LIVERMORE, D.M. Has the era of untreatable infections arrived? *J Antimicrob Chemother*, London, v. 64, n. 1, p. i29-36, set. 2009. doi: 10.1093/jac/dkp255.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkp255>

LIVERMORE, D.M. Interplay of impermeability and chromosomal beta-lactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, Washington, v. 36, n. 9, p. 2046-2048, set. 1992. doi: <https://doi.org/10.1128/aac.36.9.2046>.
<https://doi.org/10.1128/AAC.36.9.2046>

LIVERMORE, D.M. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis*, Chicago, v.34, n.5, p. 634-640, mar. 2002. doi: 10.1086/338782.
<https://doi.org/10.1086/338782>

LUCENA, A.; DALLA COSTA, L.M.; NOGUEIRA, K.S.; MATOS, A.P.; GALES, A.C.; PAGANINI, M.C.; CASTRO, M.E.; RABONI, S.M. Nosocomial infections with metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: molecular epidemiology, risk factors, clinical features and outcomes. *J Hosp Infect*, London, v. 87, n. 4, p. 234-240, ago. 2014. doi: 10.1016/j.jhin.2014.05.007.
<https://doi.org/10.1016/j.jhin.2014.05.007>

MAÂTALLAH, M.; BAKHROUF, A.; HABEEB, M. A.; TURLEJ-ROGACKA, A.; IVERSEN, A.; POURCEL, C.; SIOUD, O.; GISKE, C. G. Four genotyping schemes for phylogenetic analysis of *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of their congruence with Multi Locus Sequence Typing. *PLoS ONE*, São Francisco, v.8, n. 12, p. e82069, dez. 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0082069.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082069>

MACIEL, W.G.; SILVA, K.E.; BAMPI, J.V.; BET, G.M.; RAMOS, A.C.; GALES, A.C.; SIMIONATTO, S. Identification of São Paulo metallo-beta-lactamase-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the Central-West region of Brazil: a case study. *Rev Soc Bras Med Trop*, Rio de Janeiro, v. 50, n. 1, p. 135-137, jan./fev. 2017. doi: 10.1590/0037-8682-0284-2016.

<https://doi.org/10.1590/0037-8682-0284-2016>

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. *Clin Microbiol Infect*, London, v. 18, n. 3, p. 268-281, mar. 2012. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.

<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>

MARTINEZ, J.L.; SÁNCHEZ, M.B.; MARTÍNEZ-SOLANO, L.; HERNANDEZ, A.; GARMENDIA, L.; FAJARDO, A.; ALVAREZ-ORTEGA, C. Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. *FEMS Microbiol Rev*, Oxford, v. 33, n. 2, p. 430-449, mar. 2009. doi: https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00157.x.

<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00157.x>

MARTINEZ-NADAL, G.; PUERTA-ALCALDE, P.; GUDIOL, C.; CARDOZO, C.; ALBASANZ-PUIG, A.; MARCO, F.; LAPORTE-AMARGÓS, J.; MORENO-GARCÍA, E.; DOMINGO-DOMÉNECH, E.; CHUMBITA, M.; MARTÍNEZ, J.A.; SORIANO, A.; CARRATALÀ, J.; GARCIA-VIDAL, C. Inappropriate empirical antibiotic treatment in high-risk neutropenic patients with bacteremia in the Era of Multidrug Resistance. *Clin Infect Dis*, v. 70, n. 6, p. 1068-74, 2020. doi: https://doi.org/10.1093/cid/ciz319.

<https://doi.org/10.1093/cid/ciz319>

MATOS, E.C.; MATOS, H.J.; CONCEIÇÃO, M.L.; RODRIGUES, Y.C.; CARNEIRO, I.C.; LIMA, K.V. Clinical and microbiological features of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* in patients hospitalized in intensive care units. *Rev Soc Bras Med Trop*, Rio de Janeiro, v. 49, n. 3, p. 305-311, maio/jun. 2016. doi: 10.1590/0037-8682-0446-2015.

<https://doi.org/10.1590/0037-8682-0446-2015>

MAYER, J.; GREENE, T.; HOWELL, J.; YING, J.; RUBIN, M.A.; TRICK, W.E.; SAMORE, M.H.; CDC PREVENTION EPICENTERS PROGRAM. Agreement in classifying bloodstream infections among multiple reviewers conducting surveillance. *Clin Infect Dis*, Oxford, v. 55, n. 3, p. 364-370, ago. 2012. doi: 10.1093/cid/cis410.

<https://doi.org/10.1093/cid/cis410>

MENDES, R.E.; CASTANHEIRA, M.; PIGNATARI, A.C.; GALES, A.C. Metallo- β -lactamases. *J Pathol Lab Med*, v.42, n. 2, p.103-113, 2006.

<https://doi.org/10.1590/S1676-24442006000200007>

MENDES, R.E.; SADER, H.S.; CASTANHEIRA, M.; FLAMM, R.K. Distribution of main Gram-positive pathogens causing bloodstream infections in United States and European hospitals during the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2010-2016): concomitant analysis of oritavancin in vitro activity. *J Chemother*, Florence, v. 30 n. 5 p. 220-289, set. 2018. doi: 10.1080/1120009X.2018.1516272.

<https://doi.org/10.1080/1120009X.2018.1516272>

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. *J Hosp Infect*, London, v. 71, n. 4, p. 365-370, abr. 2009. doi: 10.1016/j.jhin.2009.01.008.

<https://doi.org/10.1016/j.jhin.2009.01.008>

MONNET, D.L.; MÖLSTAD, S.; CARS, O. Defined daily doses of antimicrobials reflect antimicrobial prescriptions in ambulatory care. *J Antimicrob Chemother*, London, v. 53, n. 6, p. 1109-1111, jun. 2004. doi: 10.1093/jac/dkh230.

<https://doi.org/10.1093/jac/dkh230>

MONTERO, M.M.; LÓPEZ MONTESINOS, I.; KNOBEL, H.; MOLAS, E.; SORLÍ, L.; SIVERIO-PARÉS, A.; PRIM, N.; SEGURA, C.; DURAN-JORDÀ, X.; GRAU, S.; HORCAJADA, J.P. Risk Factors for Mortality among Patients with *Pseudomonas aeruginosa* Bloodstream Infections: What Is the Influence of XDR Phenotype on Outcomes? *J Clin Med*, v. 9, n. 2, p.514, 2020. doi: <https://doi.org/10.3390/jcm9020514>.

<https://doi.org/10.3390/jcm9020514>

MOON, S.Y.; ZHENG, Y. Rho GTPase- activating proteins in cell regulation. *Trends Cell Biol*, Cambridge, v.13, n. 1, p.13-22, jan. 2003. doi: 10.1016/S0962-8924(02)00004-1.

[https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(02\)00004-1](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(02)00004-1)

MORADALI, M.F.; GHODS, S.; REHM, B.H.A. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Front. Cell. Infect. Microbiol*, Suíça, v. 15, n. 7, p. 39, fev. 2017. doi: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00039>.

<https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00039>

PMid:28261568 PMCID:PMC5310132

MOREIRA, M.R.; GUIMARÃES, M.P.; RODRIGUES, 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. *Rev Soc Bras Med Trop*, Uberaba, v. 46, n 1, p. 39-44, Jan-Fev 2013. doi:10.1590/0037-868216722013.

<https://doi.org/10.1590/0037-868216722013>

PMid:23563823

MULET, X.; MOYÁ, B.; JUAN, C.; MACIÀ, M.D.; PÉREZ, J.L.; BLÁZQUEZ, J.; OLIVER, A. Antagonistic interactions of *Pseudomonas aeruginosa* antibiotic resistance mechanisms in planktonic but not biofilm growth. *Antimicrob Agents Chemother*, Washington, v. 55, n. 10, p. 4560 -4568, out. 2011. doi: <https://doi.org/10.1128/AAC.00519-11>.

<https://doi.org/10.1128/AAC.00519-11>

PMid:21807976 PMCID:PMC3186965

NEOH, H.M.; TAN, X.E.; SAPRI, H.F.; TAN, T.L. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the "gold standard" for bacteria typing and current alternatives. *Infect Genet Evol*, Amsterdam, v. 74, p. 103935, out. 2019. doi: 10.1016/j.meegid.2019.103935.

<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.103935>

PMid:31233781

NGUYEN, L.; GARCIA, J.; GRUENBERG, K.; MACDOUGALL, C. Multidrug-resistant *Pseudomonas* infections: hard to treat, but hope on the horizon? *Curr Infect Dis Rep*, New York, v. 20 n. 8, p. 23, jun. 2018. doi: <https://doi.org/10.1007/s11908-018-0629-6>.

<https://doi.org/10.1007/s11908-018-0629-6>

PMid:29876674

NIKBIN, V.S.; ASLANI, M.M.; SHARAFI, Z.; HASHEMIPOUR, M.; SHAHCHERAGHI, F.; EBRAHIMPOUR, G.H. Molecular identification and detection of virulence genes among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from different infections origins. *Iran J Microbiol*, Tehran, v.4, n. 3, p.118-123, set. 2012.

OLIVEIRA, A.C; PAULA, A.O.; IQUIAPAZA, R.A.; LACERDA, C.S. Infecções relacionadas à assistência em saúde e gravidade clínica em uma unidade de terapia intensiva. *Rev Gaúcha Enferm*, Porto Alegre, v. 33, n. 3, p. 89-96, set. 2012. doi: <https://doi.org/10.1590/S1983-14472012000300012>.

<https://doi.org/10.1590/S1983-14472012000300012>

PMid:23405813

OLIVEIRA, H.M.; SILVA, C.P.R.; LACERDA, R.A. Políticas de controle e prevenção de infecções relacionadas à assistência à saúde no Brasil: análise conceitual. *Rev Esc Enferm USP*, São Paulo, v. 50, n. 3, p. 505-511, 2016. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0080-623420160000400018>.

<https://doi.org/10.1590/S0080-623420160000400018>

PMid:27556723

OLIVEIRA, P.M.N.; BUONORA, S.N.; SOUZA, C.L.P.; SIMÕES JÚNIOR, R.; SILVA, T.C.D.; BOM, G.J.T.; TEIXEIRA, C.H.D.S.; SILVA, A.R.A.D. Surveillance of multidrug-resistant bacteria in pediatric and neonatal intensive care units in Rio de Janeiro State, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*, Uberaba, v. 52, p. e20190205, set 2019. doi: 10.1590/0037-8682-0205-2019.

<https://doi.org/10.1590/0037-8682-0205-2019>

PMid:31508783

OLIVER, A.; MULET, X.; LÓPEZ-CAUSAPÉ, C.; JUAN, C. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resist Updat*, Philadelphia, v. 21, n. 22, p. 41-59, jul/ago. 2015. doi: <https://doi.org/10.1016/J.DRUP.2015.08.002>.

<https://doi.org/10.1016/j.drup.2015.08.002>

PMid:26304792

ONG, D.S.; JONGERDEN, I.P.; BUITING, A.G.; LEVERSTEIN-VAN HALL, M.A.; SPEELBERG, B.; KESECIOGLU, J.; BONTEN, M.J. Antibiotic exposure and resistance development in *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter* species in intensive care units. *Crit*

Care Med, New York, v. 39, n. 11, p. 2458-2463, nov. 2011. doi: 10.1097/CCM.0b013e318225756d.

<https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e318225756d>

PMid:21705892

PADOVEZE, M.C.; ASSIS, D.B.; FREIRE, M.P.; MADALOSSO, G.; FERREIRA, S.A.; VALENTE, M.G.; FORTALEZA, C.M. Surveillance Programme for Healthcare Associated Infections in the State of São Paulo, Brazil. Implementation and the first three years' results. *J Hosp Infect*, New York, v. 76, n. 4, p. 311-315, 2010. Doi:

<https://doi.org/10.1016/j.jhin.2010.07.005>

<https://doi.org/10.1016/j.jhin.2010.07.005>

PMid:20884080

PADOVEZE, M.C.; FORTALEZA, C.M. Healthcare-associated infections: challenges to public health in Brazil. *Rev Saúde Publica*, São Paulo, v. 48, n. 6, p. 995-1001, dez. 2014. doi: 10.1590/S0034-8910.2014048004825.

<https://doi.org/10.1590/S0034-8910.2014048004825>

PMid:26039403 PMCID:PMC4285833

PAPAZIAN, L.; KLOMPAS, M.; LUYT, C.E. Ventilator-associated pneumonia in adults: a narrative review. *Intensive Care Med*, Estados Unidos, mar. 2020. doi: 10.1007/s00134-020-05980-0.

<https://doi.org/10.1007/s00134-020-05980-0>

PMid:32157357 PMCID:PMC7095206

PATEL, G.; BONOMO, R.A. Status report on carbapenemases: challenges and prospects. *Expert Rev Anti Infect Ther*, London, v. 9, n. 5, p. 555-570, maio 2011. doi: <https://doi.org/10.1586/eri.11.28>.

<https://doi.org/10.1586/eri.11.28>

PMid:21609267

PELEG, A.Y.; HOOPER, D.C. Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria. *N Engl J Med*, Boston, v. 362, n. 19, p. 1804-1813, nov. 2010. doi: 10.1056/NEJMra0904124.

<https://doi.org/10.1056/NEJMra0904124>

PMid:20463340 PMCID:PMC3107499

PELLEGRINO, F.L.; NETTO-DOS SANTOS, K.R.; RILEY, L.W.; MOREIRA, B.M. bla_{GES} carrying *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a public hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Infect Dis*, v.10, n. 4, p. 251-253, ago. 2006. doi: 10.1590/s1413-86702006000400007.

<https://doi.org/10.1590/S1413-86702006000400007>

PMid:17293906

PENA, C.; CABOT, G.; GOMEZ-ZORRILLA, S.; ZAMORANO, L.; OCAMPO-SOSA, A.; MURILLAS, J.; ALMIRANTE, B.; POMAR, V.; AGUILAR, M.; GRANADOS, A.; CALBO, E.; RODRIGUEZ-BANO, J.; RODRIGUEZ-LOPEZ, F.; TUBAU, F.; MARTINEZ-MARTINEZ, L.; OLIVER, A.; GURGUI, M.; SORDE, R.; LARROSA, N.; MARTIN, C.; FONTANALS, D.; CUETO, M.; NAVARRO, M.D.; TORRE-CISNEROS, J.; CASAL, M.; LARA, R.; NATERA, C.; RIVERO, A.; SPANISH NETWORK FOR RESEARCH IN

INFECTIOUS DISEASES (REIPI). Influence of virulence genotype and resistance profile in the mortality of *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. *Clin Infect Dis*, London, v. 60, n. 4, p. 539-548, fev. 2015. doi: <https://doi.org/10.1093/cid/ciu866>. 6.

<https://doi.org/10.1093/cid/ciu866>

PMid:25378459

PEREIRA, M.O. Caracterização fenotípica e genotípica de *Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas aeruginosa* produtores de carbapenemases. 2017. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

PEREIRA, S.M.S.G. *Pseudomonas aeruginosa* em ambiente termal: prevalência e determinantes de patogenicidade. 2013. Tese de Doutorado - Pós Graduação em Microbiologia e Parasitologia, Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2013.

PFALLER, M.A.; CARVALHAES, C.G.; SMITH, C.J.; DIEKEMA, D.J.; CASTANHEIRA, M. Bacterial and fungal pathogens isolated from patients with bloodstream infection: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns from the sentry antimicrobial surveillance program (2012-2017). *Diagn Microbiol Infect Dis*, New York, v. 13, p. 115016, fev. 2020. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2020.115016.

<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2020.115016>

PMid:32111415

PIMENTA, A. L.; DI MARTINO, P.; BLIGHT, M. A. Positive correlation between in vivo and in vitro assays for the evaluation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Res Microbiol*, Paris, v. 157, n. 9, p. 885-890, nov. 2006. doi: 10.1016/j.resmic.2006.06.005.

<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2006.06.005>

PMid:16901681

PITTET, D.; DONALDSON, L. Challenging the world: Patient safety and health care associated infection. *Inter J Quality Health Care*, v. 18, n. 1, p. 4-8, 2006.

<https://doi.org/10.1093/intqhc/mzi093>

<https://doi.org/10.1093/intqhc/mzi093>

PMid:16396940

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. *Antimicrob Agents Chemother*, Washington, v. 54, n. 6, p. 2420-2424, jun 2010. doi: 10.1128/AAC.01456-09.

<https://doi.org/10.1128/AAC.01456-09>

PMid:20308383 PMCID:PMC2876379

POIREL, L.; WELDHAGEN, G.F.; NAAS, T.; De CHAMPS, C.; DOVE, M.G.; NORDMANN, P. GES-2, a class A β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrob Agents Chemother*, Washington, v.45, n. 9, p. 2598-2603, set. 2001. doi: 10.1128/aac.45.9.2598-2603.2001.

<https://doi.org/10.1128/AAC.45.9.2598-2603.2001>

PMid:11502535 PMCID:PMC90698

POPOVIĆ, R.; TOMIĆ, Z.; TOMAS, A.; ANĐELIĆ, N.; VICKOVIĆ, S.; JOVANOVIĆ, G.; BUKUMIRIĆ, D.; HORVAT, O.; SABO, A. Five-year surveillance and correlation of antibiotic consumption and resistance of Gram-negative bacteria at an intensive care unit in Serbia. *J Chemother*, v. 23, p. 1-10, 2020. doi: 10.1080/1120009X.2020.1755588.

<https://doi.org/10.1080/1120009X.2020.1755588>

PMid:32321359

PONCE DE LEON, A.; MERCHANT, S.; RAMAN, G.; AVENDANO, E.; CHAN, J.; HERNANDEZ, T. G.; SARPONG, E. Pseudomonas infections among hospitalized adults in Latin America: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis*, London, v. 20, n. 1, p. 250, mar. 2020. doi: 10.1186/s12879-020-04973-0.

<https://doi.org/10.1186/s12879-020-04973-0>

PMid:32220233 PMCID:PMC7099820

QUALE, J.; BRATU, S.; GUPTA, J.; LANDMAN, D. Interplay of efflux system, ampC and oprD expression in carbapenem resistance of Pseudomonas aeruginosa clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemotherapy*, Washington, v. 50, n. 5, p. 1633-1641, maio 2006. doi: 10.1128/AAC.50.5.1633-1641.2006.

<https://doi.org/10.1128/AAC.50.5.1633-1641.2006>

PMid:16641429 PMCID:PMC1472219

QUILES, M.G.; CARLESSE, F.; DA SILVA, M.A.; MINGRONE, R.C.; FONSECA, J.M.; SILVA, D.C.; PIGNATARI, A.C. High mortality outbreak of carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa infection in a Brazilian pediatric oncology hospital. *Braz J Infect Dis*, Salvador, v. 21, n. 2, p. 205-206, mar./abr. 2017. doi: 10.1016/j.bjid.2016.10.012.

<https://doi.org/10.1016/j.bjid.2016.10.012>

PMid:27986489

RESENDE, M.M.; MONTEIRO, S.G.; CALLEGARI, B.; FIGUEIREDO, P.M.; MONTEIRO, C.R.; MONTEIRO-NETO, V. Epidemiology and outcomes of ventilator-associated pneumonia in northern Brazil: an analytical descriptive prospective cohort study. *BMC Infect Dis*, v. 13, p. 119, mar 2013. doi: 10.1186/1471-2334-13-119.

<https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-119>

PMid:23510379 PMCID:PMC3599186

RETAMAR, P.; PORTILLO, M.M.; LÓPEZ-PRIETO, M.D.; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, F.; CUETO, M.; GARCÍA, M.V.; GÓMEZ, M.J.; DEL ARCO, A.; MUÑOZ, A.; SÁNCHEZ-PORTO, A.; TORRES-TORTOSA, M.; MARTÍN-ASPAS, A.; ARROYO, A.; GARCÍA-FIGUERAS, C.; ACOSTA, F.; CORZO, J.E.; LEÓN-RUIZ, L.; ESCOBAR-LARA, T.; RODRÍGUEZ-BAÑO, J.; SAEI/SAMPAC BACTEREMIA GROUP. Impact of inadequate empirical therapy on the mortality of patients with bloodstream infections: a propensity score-based analysis. *Antimicrob Agents Chemother*, Washington, v. 56, n. 1, p. 472-478, jan 2012. doi: 10.1128/AAC.00462-11.

<https://doi.org/10.1128/AAC.00462-11>

PMid:22005999 PMCID:PMC3256027

RICHARDS, M.J.; EDWARDS, J.R.; CULVER, D.H.; GAYNES, R.P. Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States. *National Nosocomial Infections*

Surveillance System. *Crit Care Med*, v. 27, n. 5, p. 887-892, maio 1999.
<https://doi.org/10.1097/00003246-199905000-00020>
<https://doi.org/10.1097/00003246-199905000-00020>
 PMid:10362409

RIERA, E.; CABOT, G.; MULET, X.; GARCÍA-CASTILLO, M.; DEL CAMPO, R.; JUAN, C.; CANTÓN, R.; OLIVER, A. Pseudomonas aeruginosa carbapenem resistance mechanisms in Spain: impact on the activity of imipenem, meropenem and doripenem. *J Antimicrob Chemother*, London, v. 66, n. 9, p. 2022-2027, set. 2011. doi: <https://doi.org/10.1093/jac/dkr232>.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkr232>
 PMid:21653605

RIZEK, C.; FU, L.; DOS SANTOS, L. C.; LEITE, G.; RAMOS, J.; ROSSI, F.; GUIMARAES, T.; LEVIN, A. S; FIGUEIREDO, C. S. Characterization of carbapenem resistant Pseudomonas aeruginosa clinical isolates, carrying multiple genes coding for this antibiotic resistance. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, London, v.13, p.43, set. 2014. doi: 10.1186/s12941-014-0043-3.
<https://doi.org/10.1186/s12941-014-0043-3>
 PMid:25179208 PMCID:PMC4282171

ROSENTHAL, V.D.; BIJIE, H.; MAKI, D.G.; MEHTA, Y.; APISARNTHANARAK, A.; MEDEIROS, E.A.; LEBLEBICIOGLU, H.; FISHER, D.; ÁLVAREZ-MORENO, C.; KHADER, I.A.; DEL ROCÍO GONZÁLEZ MARTÍNEZ, M.; CUELLAR, L.E.; NAVOA-NG, J.A.; ABOUQAL, R.; GUANCHE GARCELL, H.; MITREV, Z.; PIREZ GARCÍA, M.C.; HAMDI, A.; DUEÑAS, L.; CANCEL, E.; GURSKIS, V.; RASSLAN, O.; AHMED, A.; KANJ, S.S.; UGALDE, O.C.; MAPP, T.; RAKA, L.; YUET MENG, C.; THU LE, T.A.; GHAZAL, S.; GIKAS, A.; NARVÁEZ, L.P.; MEJÍA, N.; HADJIEVA, N.; GAMAR ELANBYA, M.O.; GUZMÁN SIRITT, M.E.; JAYATILLEKE, K.; INICC MEMBERS. International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary of 36 countries, for 2004-2009. *Am J Infect Control*, v. 40, n. 5, p. 396-407, Jun 2012. doi: 10.1016/j.ajic.2011.05.020.
<https://doi.org/10.1016/j.ajic.2011.05.020>
 PMid:21908073

ROSENTHAL, V.D.; MAKI, D.G.; SALOMÃO, R.; MORENO, C.A.; MEHTA, Y.; HIGUERA, F.; CUELLAR, L.E.; ARIKAN, O.A.; ABOUQAL, R.; LEBLEBICIOGLU, H.; INTERNATIONAL NOSOCOMIAL INFECTION CONTROL CONSORTIUM. Device-associated nosocomial infections in 55 intensive care units of 8 developing countries. *Annals of Internal Medicine*, v. 145, n. 8, p. 582-591, Out 2006. doi: 10.7326/0003-4819-145-8-200610170-00007.
<https://doi.org/10.7326/0003-4819-145-8-200610170-00007>
 PMid:17043340

ROYER, S.; FARIA, A.L.; SEKI, L.M.; CHAGAS, T.P.; CAMPOS, P.A.; BATISTÃO, D.W.; ASENSI, M.D.; GONTIJO FILHO, P.P.; RIBAS, R.M. Spread of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa clones in patients with ventilator-associated pneumonia in an adult intensive care unit at a university hospital. *Braz J Infect Dis*, Salvador, v. 19, n. 4, p. 350-7, jul-ago 2015. doi: 10.1016/j.bjid.2015.03.009.
<https://doi.org/10.1016/j.bjid.2015.03.009>
 PMid:25997783

RUIZ, J.; RAMIREZ, P.; GORDON, M.; VILLARREAL, E.; FRASQUET, J.; POVEDA-ANDRES, J.L.; SALAVERT-LLETÍ, M.; CATELLANOS, A. Antimicrobial stewardship programme in critical care medicine: a prospective interventional study. *Med Intensiva*, Madrid, v. 42, n. 5, p. 266-273, jun 2018. doi: 10.1016/j.medin.2017.07.002.

<https://doi.org/10.1016/j.medin.2017.07.002>

PMid:28882325

RUTHERFORD, V.; YOM, K.; OZER, E.A.; PURA, O.; HUGHES, A.; MURPHY, K.R.; CUDZILO, L.; MITCHELL, D.; HAUSER, A.R. Environmental reservoirs for *exoS+* and *exoU+* strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol Rep*, United States, v. 10, n. 4, p. 485-492, ago. 2018. doi:10.1111/1758-2229.12653.

<https://doi.org/10.1111/1758-2229.12653>

PMid:29687624 PMCID:PMC6108916

SABAT, A.J.; BUDIMIR, A.; NASHEV, D.; SÁ-LEÃO, R.; VAN DIJL, J.M.; LAURENT, F.; GRUNDMANN, H.; FRIEDRICH, A.W.; ESCMID STUDY GROUP OF EPIDEMIOLOGICAL MARKERS (ESGEM). Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro Surveill*, Stockholm, v.18, n.4, p.1-15, jan. 2013. doi: 10.2807/ese.18.04.20380-en.

<https://doi.org/10.2807/ese.18.04.20380-en>

SADER, H.S.; CASTANHEIRA, M.; DUNCAN, L.R.; FLAMM, R.K. Antimicrobial susceptibility of Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* isolates from United States medical centers stratified by infection type: results from the International Network for Optimal Resistance Monitoring (INFORM) surveillance program. *Diagn Microbiol Infect Dis*, New York, v. 92, n. 1, p. 69 -74, set. 2018. doi: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.04.012>.

<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.04.012>

PMid:29789189

SADER, H.S.; CASTANHEIRA, M.; FARRELL, D.J.; FLAMM, R.K.; MENDES, R.E.; JONES, R.N. Tigecycline antimicrobial activity tested against clinical bacteria from Latin American medical centres: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2011-2014). *Int J Antimicrob Agents*, Amsterdam, v. 48, n. 2, p. 144-150, ago. 2016. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.04.021.

<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.04.021>

PMid:27291285

SAIER, M.H.Jr.; PAULSEN, I. Phylogeny of multidrug transporters. *Semin Cell Dev Biol*, London, v. 12, n. 3, p.205-213, jun. 2001. doi: 10.1006/scdb.2000.0246.

<https://doi.org/10.1006/scdb.2000.0246>

PMid:11428913

SALABI, A.E.; TOLEMAN, M.A.; WEEKS, J.; BRUDERER, T.; FREI, R.; WALSH, T.R. First report of the metallo-beta-lactamase SPM-1 in Europe. *Antimicrob Agents Chemother*, Washington, v. 54, n. 1, p. 582, jan. 2010. doi: <https://doi.org/10.1128/AAC.00719-09>.

<https://doi.org/10.1128/AAC.00719-09>
PMid:19858251 PMCID:PMC2798548

SANTOS, I.C.O.; ANDRADE, N.F.P.; CONCEIÇÃO NETO, O.C.; COSTA, B.S.; MARQUES, E.A.; SOUZA, C.M.R.; ASENSI, M.D.; ASSEF, A.P.C.A.C. Epidemiology and antibiotic resistance trends in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Rio de Janeiro - Brazil: Importance of mutational mechanisms over the years (1995-2015). *Infect Genet Evol*, Amsterdam, v. 73, p. 411-415, set. 2019. doi: 10.1016/j.meegid.2019.05.015.

<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.05.015>

PMid:31121306

SAWA, T.; SHIMIZUL, M.; MORIYAMA, K.; WIENER-KRONISH, J.P. Association between *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion, antibiotic resistance, and clinical outcome: a review. *Crit Care*, London, v.18, n. 6, p. 668-679, dez. 2014. doi: 10.1186/s13054-014-0668-9.

<https://doi.org/10.1186/s13054-014-0668-9>

PMid:25672496 PMCID:PMC4331484

SCHÄFER, E.; MALECKI, M.; TELLEZ-CASTILLO, C.J.; PFENNIGWERTH, N.; MARLINGHAUS, L.; HIGGINS, P.G.; MATTNER, F.; WENDEL, A.F. Molecular surveillance of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* at three medical centres in Cologne, Germany. *Antimicrob Resist Infect Control*, London, v. 8, p. 208, dez. 2019. doi: 10.1186/s13756-019-0665-5.

<https://doi.org/10.1186/s13756-019-0665-5>

PMid:31893042 PMCID:PMC6937969

SHORTRIDGE, D.; GALES, A.C.; STREIT, J.M.; HUBAND, M.D.; TSAKRIS, A.; JONES, R.N. Geographic and temporal patterns of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* over 20 years from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-2016. *Open Forum Infect Dis*, United States, v. 15v n. 6, p. S63-S68, mar. 2019. doi: 10.1093/ofid/ofy343.

<https://doi.org/10.1093/ofid/ofy343>

PMid:30895216 PMCID:PMC6419917

SILBY, M.W.; WINSTANLEY, C.; GODFREY, S.A.C.; LEVY, S.B.; JACKSON, R.W. *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiol Rev*, Amsterdam, v. 35, n. 4, p. 652-680, jul. 2011. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00269.x>.

<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00269.x>

PMid:21361996

SILVA, K.C.F.A. Caracterização de *Pseudomonas aeruginosa* encontradas colonizando e/ou infectando pacientes queimados internados em um hospital público da cidade do Rio de Janeiro. 2016. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas a Produtos Para a Saúde, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2016.

SOSA, A.J.; BYARUGABA, D.K.; AMÁBILE-CUEVAS, C.F.; HSUEH, P.; KARIUKI, S.; OKEKE, I.N. Antimicrobial resistance in developing countries. 1ª ed. Springer Science Business Media, 2010.

<https://doi.org/10.1007/978-0-387-89370-9>

SOUZA, L.C.D.; MOTA, V.B.R.D.; CARVALHO, A.V.D.S.Z.; CORRÊA, R.D.G.C.F.; LIBÉRIO, S.A.; LOPES, F.F. Association between pathogens from tracheal aspirate and oral biofilm of patients on mechanical ventilation. *Braz Oral Res*, v. 31, p. e38, jun 2017. doi: 10.1590/1807-3107BOR-2017.vol31.0038.

<https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2017.vol31.0038>

STARLING, C.E.; COUTO, B.R.; PINHEIRO, S.M. Applying the Centers for Disease Control and Prevention and National Nosocomial Surveillance system methods in Brazilian hospitals. *Am J Infect Control*, v. 25, n. 4, p. 303-311, 1997. [https://doi.org/10.1016/s0196-6553\(97\)90022-5](https://doi.org/10.1016/s0196-6553(97)90022-5).

[https://doi.org/10.1016/S0196-6553\(97\)90022-5](https://doi.org/10.1016/S0196-6553(97)90022-5)

STRATEVA, T.; MITOV, I. Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Ann Microbiol, Milano*, v. 61, n. 4, p. 717-732, dez. 2011. doi: 10.1007/s13213-011-0273-y.

<https://doi.org/10.1007/s13213-011-0273-y>

SUBEDI, D.; VIJAY, A.K.; KOHLI, G.S.; RICE, S.A.; WILLCOX, M. Association between possession of ExoU and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *PloS One*, San Francisco, n. 13, n. 9, p. e0204936, set. 2018. doi:

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204936>.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204936>

PMid:30265709 PMCID:PMC6161911

TAKATA, I.; YAMAGISHI, Y.; MIKAMO, H. Association of the exoU genotype with a multidrug non-susceptible phenotype and mRNA expressions of resistance genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Chemother*, Amsterdam, v. 24, n. 1, p. 45-52, jan. 2018. doi: 10.1016/j.jiac.2017.08.018.

<https://doi.org/10.1016/j.jiac.2017.08.018>

PMid:29107652

TSAO, L.H.; HSIN, C.Y.; LIU, H.Y.; CHUANG, H.C.; CHEN, L.Y.; LEE, Y.J. Risk factors for healthcare-associated infection caused by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Microbiol Immunol Infect*, Oxford, v. 51, n. 3, p. 359-366, jun. 2018. doi:

10.1016/j.jmii.2017.08.015.

<https://doi.org/10.1016/j.jmii.2017.08.015>

PMid:28988663

VALLÉS, J.; ALVAREZ-LERMA, F.; PALOMAR, M.; BLANCO, A.; ESCORESCA, A.; ARMESTAR, F.; SIRVENT, J.M.; BALASINI, C.; ZARAGOZA, R.; MARÍN, M.; STUDY GROUP OF INFECTIOUS DISEASES OF THE SPANISH SOCIETY OF CRITICAL CARE MEDICINE. Health-care-associated bloodstream infections at admission to the ICU. *Chest*, New York, v. 139, n. 4, p. 810-815, abr. 2011. doi: 10.1378/chest.10-1715.

<https://doi.org/10.1378/chest.10-1715>

PMid:21106655

VALOT, B.; GUYEUX, C.; ROLLAND, J.Y.; MAZOUZI, K.; BERTRAND, X.; HOCQUET, D. What it takes to be a *Pseudomonas aeruginosa*? The core genome of the opportunistic

pathogen updated. PLoS One, San Francisco, v. 10, n. 5, p. e0126468, maio 2015. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126468>.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126468>
 PMid:25961859 PMCID:PMC4427113

VANCE, R. E.; RIETSCH, A.; MEKALANOS, J.J. Role of the type III secreted exoenzymes S, T, and Y in systemic spread of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in vivo. *Infect Immun*,

Washington, v. 73, n. 3, p.1706-1713, mar. 2005. doi: 10.1128/iai.73.3.1706-1713.2005.
<https://doi.org/10.1128/IAI.73.3.1706-1713.2005>
 PMid:15731071 PMCID:PMC1064930

VINCENT, J. International Study of the Prevalence and Outcomes of Infection in Intensive Care Units. *JAMA*, v. 302, n. 21, p. 2323, 2 dez. 2009. <https://doi.org/10.1001/jama.2009.1754>
<https://doi.org/10.1001/jama.2009.1754>
 PMid:19952319

VINCENT, J.L. Nosocomial Infections in Adult Intensive-Care Units. *The Lancet*, London, v. 361, n. 9374, p. 2068-77, jun. 2003. doi: 10.1016/S0140-6736(03)13644-6.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)13644-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)13644-6)

VON WINTERSDORFF, C.J.; PENDERS, J.; VAN NIEKERK, J.M.; MILLS, N.D.; MAJUMDER, S.; VAN ALPHEN, L.B.; SAVELKOUL, P.H.; WOLFFS, P.F. Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Front Microbiol*, v. 19, n. 7, p. 173, Fev. 2016. doi: 10.3389/fmicb.2016.00173.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00173>
 PMid:26925045 PMCID:PMC4759269

XAVIER, D.E.; PICAPO, R.C.; GIRARDELLO, R.; FEHLBERG, L.C.C.; GALES, A.A. Efflux pumps expression and its association with porin down-regulation and β -lactamase production among *Pseudomonas aeruginosa* causing bloodstream infections in Brazil. *BMC Microbiology*, Londres, v.10, n. 217, p. 1-7, ago. 2010. doi: 10.1186/1471-2180-10-217.
<https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-217>
 PMid:20704733 PMCID:PMC2927533

WALKTY, A.; LAGACE-WIENS, P.; ADAM, H.; BAXTER, M.; KARLOWSKY, J.; MULVEY, M.R.; MCCracken, M.; Zhanel, G.G. Antimicrobial susceptibility of 2906 *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates obtained from patients in Canadian hospitals over a period of 8 years: Results of the Canadian Ward surveillance study (CANWARD), 2008 -2015. *Diagn Microbiol Infect Dis*, New York, v. 87, n. 1, p. 60 - 63, jan. 2017. doi: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.10.003>. 7.
<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.10.003>
 PMid:28336136

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The World Medicines Situation 2011: Rational use of antibiotics. Geneva, Switzerland: WHO; 2011. Disponível em: https://www.who.int/medicines/areas/policy/world_medicines_situation/WMS_ch14_wRatio.pdf . Acesso em: 10 abr. 2020.

WONG-BERINGER, A.; WIENER-KRONISH, J.; LYNCH, S.; FLANAGAN, J. Comparison of type III secretion system virulence among fluoroquinolone-susceptible and - resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect*, London, v. 14, n. 4, p. 330- 336, abr. 2008. doi: 10.1111/j.1469-0691.2007.01939.x.

<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01939.x>

PMid:18190571

YONG, D.; BELL, J.; RITCHIE, B.; PRATT, R.; TOLEMAN, M. A.; WALSH, T. R. A novel sub group metallo- β -lactamase (MBL), AIM-1 emerges in *Pseudomonas aeruginosa* (PSA) from Australia, abstr. C1-593. In: 47th ANNUAL INTERSCIENCE CONFERENCE ON ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY (ICAAC), 2007, Chicago. *Anais [...]* 2007. Chicago.

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. *Antimicrob Agents Chemother*, Washington, v. 53, n. 12, p. 5046-5054, dez. 2009. doi: 10.1128/AAC.00774-09.

<https://doi.org/10.1128/AAC.00774-09>

PMid:19770275 PMCID:PMC2786356

YU, F.; YING, Q.; CHEN, C.; LI, T.; DING, B.; LIU, Y.; QIN, Z.; PARSONS, C.; SALGADO, C.; QU, D.; PAN, J.; WANG, L. Outbreak of pulmonary infection caused by *Klebsiella pneumoniae* isolates harbouring blaIMP-4 and blaDHA-1 in a neonatal intensive care unit in China. *J Med Microbiol*, London, v.61, n. 7, p.984-989, jul. 2012. doi: 10.1099/jmm.0.043000-0.

<https://doi.org/10.1099/jmm.0.043000-0>

PMid:22466031

ZAIDI, A.K.; HUSKINS, W.C.; THAYER, D.; BHUTTA, Z.A.; ABBAS, Z.; GOLDMANN, D.A. Hospital-acquired neonatal infections in developing countries. *The Lancet*, London, v. 365, n. 9465, p. 1175-1188, mar/abr. 2005. doi: 10.1016/S0140-6736(05)71881-X.

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)71881-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)71881-X)

ZARKOTOU, O.; POURNARAS, S.; TSELIOTI, P.; DRAGOUMANOS, V.; PITIRIGA, V.; RANELLOU, K.; PREKATES, A.; THEMELI-DIGALAKI, K.; TSAKRIS, A. Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* and impact of appropriate antimicrobial treatment. *Clin Microbiol Infect*, London, v. 17, n. 12, p. 1798-1803, dez. 2011. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03514.x.

<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03514.x>

PMid:21595793

Capítulo II

Artigo 1

High mortality by Nosocomial Infections caused by carbapenem-resistant *P. aeruginosa* in a referral hospital in Brazil: Facing the perfect storm

Running Head: Infection by *P. aeruginosa*: Facing the perfect storm

Jane Eire Urzedo^a, Ralciane de Paula Menezes^b, Juliana Pena Porto^c, Melina Lorraine Ferreira^a, Iara Rossi Gonçalves^a, Cristiane Silveira de Brito^a, Paulo P. Gontijo-Filho^a, Rosineide Marques Ribas^{a#}

^aInstitute of Biomedical Sciences (ICBIM), Laboratory of Molecular Microbiology, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Minas Gerais, Brazil

^bTechnical School of Health (ESTES), Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Minas Gerais, Brazil

^cMedical College (FAMED), Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Minas Gerais, Brazil

#Address correspondence to Rosineide Marques Ribas, rosi_ribas@yahoo.com.br

Author contributions

Jane Eire Urzedo, Paulo P. Gontijo-Filho and Rosineide Marques Ribas planned the study, conducted the experiments, interpreted the results, prepared the first manuscript draft and reviewed the manuscript. Ralciane de Paula Menezes and Melina Lorraine Ferreira interpreted the results, prepared the first manuscript draft and reviewed the manuscript. Juliana Pena Porto, Iara Rossi Gonçalves and Cristiane Silveira de Brito reviewed the manuscript.

ABSTRACT

Introduction: Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* is responsible for increased patient mortality.

Aims: Five and 30-day in-hospital all-cause mortality in patients with *P. aeruginosa* infections were assessed, followed by evaluations concerning potential correlations between the Type III Secretion System (T3SS) genotype and the production of metallo β lactamase (MBL).

Methodology: This assessment comprised a retrospective cohort study including consecutive patients with carbapenem resistant infections hospitalized in a hospital in Brazil from January 2009 to June 2019. PCR analyses were performed to determine the presence of T3SS-encoding genes and MBL genes.

Results: The 30-day and 5-day mortality rates for 262 patients were 36.6%, and 17.9%, respectively. The unadjusted survival probabilities for up to 5 days were 70.5% for patients presenting *exoU*-positive isolates and 86% for those presenting *exo*-negative isolates. The use of urinary catheters, as well as the presence of comorbidity conditions, secondary bacteremia related to the respiratory tract, were independently associated with death at 5 and 30-days. The *exoS* gene was detected in 64.8% of the isolates, the presence of the *exoT* and *exoY* genes varied and *exoU* genes occurred in 19.3% of the isolates. The *exoU* genotype was significantly more frequent among multiresistant strains. MBL genes were not detected in 92% of the isolates.

Conclusions: Inappropriate empirical therapy is a crucial factor regarding the worse prognosis among patients with infections caused by multiresistant *P. aeruginosa*, especially those who died within 5 days of diagnosis, regardless of the genotype associated with T3SS virulence.

Keywords: Type III secretion system; multi-drug resistance; virulence; carbapenem-resistant Enterobacteriaceae; *Pseudomonas aeruginosa*.

INTRODUCTION

Infection epidemiology in hospitalized patients has exhibited a changing profile in the last few decades in Brazil, with significant increases in Gram-negative bacilli (GNB), as well as a progressive rise in multidrug-resistant (MDR) strains. For this reason, inappropriate empirical antibiotic treatment of patients presenting infection by multidrug-resistance bacteria has become a major challenge [1-3]. Information regarding the current impact of inappropriate empirical therapy on patients with nosocomial infection, however, is lacking.

Studies have reported heightened resistance levels in *P. aeruginosa*, with an increasing prevalence, ranging between 15 and 60% in certain countries [3-5]. Carbapenem resistance in *P. aeruginosa* isolates is an emerging problem, with nosocomial outbreaks of this microorganism occurring worldwide, mainly in Brazil, contributing to increased morbidity and mortality rates, hospitalization time and treatment costs [6-8]. The resistance of *P. aeruginosa* to carbapenems has been reported as over 60% in some Brazilian hospitals, and around 50% in other developing countries, like Iran [9,10]. The production of metallo- β -lactamase (MBL) encoded by the *bla_{SPM-1}*, *bla_{VIM}* and *bla_{IPM}* genes is considered the main antibiotic resistance mechanism [10-12]. However, poor outcomes concerning *P. aeruginosa* infections have also been associated to factors related to the host, the antibiotic treatment, and the microorganism itself [7,13].

In addition to multidrug resistance, studies have shown that the type III secretion system (T3SS), which delivers effector toxins (ExoS, ExoT, ExoY and ExoU) directly into host cells [14,15], is associated with worse clinical outcomes and higher mortality rates in patients infected with *P. aeruginosa* [16,17]. Aggravating this scenario, some data from epidemiological studies published in the literature suggest that *P. aeruginosa* strains positive for the *exoU* gene exhibit higher multidrug resistance and more significant mortality rates than those expressing other T3SS genes [16,18,19].

In light of the current knowledge gap concerning local epidemiology, this study aimed to identify mortality risk factors by carbapenem resistant *P. aeruginosa* infections in this setting for 5 and 30-day in-hospital patients in a large tertiary hospital in Brazil, followed by assessments on the potential correlation between the T3SS effector genotype (*exoU*, *exoS*, *exoT* and *exoY*) and MBL production.

METHODS

Patients and setting

This ten-year retrospective cohort study was carried out at the Clinical Hospital, belonging to the Federal University of Uberlândia (HC-UFU), a 506-bed tertiary-care university hospital. All patients presenting at least one episode of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* infection between January 2009 and June 2019 were included in the study. Only the first infection episode was analyzed for patients presenting more than one episode.

Study design and data collection

This ten-year investigation was employed to identify mortality predictors and the impact of inappropriate empirical therapy on the outcomes of patients presenting *P. aeruginosa* infections.

The following patient data were obtained from patient records: age, gender, total length of hospital stay, admission to the ICU, surgery, invasive procedures, such as mechanical ventilation (MV), central venous line, urinary catheter, tracheostomy, haemodialysis, catheter enteral or gastric nutrition, and surgical drain during the current hospitalization, underlying conditions such as diabetes mellitus, chronic renal failure, heart failure and cancer, bacteremia sources, antibiotic use during the current hospitalization and cases of previous antimicrobial use and inappropriate antimicrobial therapy.

The previous use of one or more of the following antibiotics was verified: piperacillin/tazobactam, gentamicin, amikacin, cefepima, ciprofloxacin, colistin and carbapenems. These antibiotics exhibit antipseudomonal activity and are part of the local antibiotic policy.

Antimicrobial therapy was considered inappropriate when the patient was given antimicrobials that did not present "*in vitro*" activity and/or when treatment was started over 48 hours after infection [20,21].

Multidrug resistance (MDR) was defined as acquired non-susceptibility to at least one agent belonging to three or more antimicrobial categories [22].

The primary endpoints of this study were 5 and 30-day in-hospital all-cause mortalities.

Bacterial isolates and molecular testing

Cultures were obtained according to the HC-UFU Microbiology Laboratory protocol. Microbial identification and antimicrobial susceptibility tests were performed by automation

using the Vitek® Biomérieux system, and strains displaying intermediate susceptibility were considered resistant.

A multiplex PCR was performed with 138 isolates to assess the presence of MBL genes (*bla*_{IPM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{GIM}, *bla*_{NDM} and *bla*_{SPM}) in *P. aeruginosa* strains, as described previously [23]. Briefly, for a final reaction volume of 25 µL, 1 µL of the extracted DNA suspension, ultrapure water, a Taq buffer solution [10x] diluted to a final concentration of [1x], 0.05 U of Taq DNA polymerase containing MgCl₂ (Promega Corporation), four deoxyribonucleotides (dNTPs) at a concentration of 0.2 mM (Promega Corporation) and 0.5 µM of the *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{GIM}, *bla*_{SIM}, *bla*_{SPM} primers was used. The cycling conditions were: 94°C for 5 minutes, followed by 30 denaturation cycles at 94°C for 30 seconds, annealing at 53°C for 45 seconds and an extension step at 72°C for 30 seconds, followed by a final extension at 72°C at 10 minutes. The PCR products were subjected to electrophoresis on 1.5% agarose gels in a TBE buffer (0.089 M Tris-borate, 0.002 M EDTA) and 1 µL of SYBR® Safe (Invitrogen) and every 20 mL of gel was subjected to a constant voltage of 90 V, visualized under UV light and photographically documented using a L-Pix EX system (Loccus Biotechnology).

The presence of T3SS virulence genes (*exoS*, *exoY*, *exoT* and *exoU*) in 88 isolates was determined by simplex PCR, as described previously [24]. For amplification of the cytotoxin-coding genes *exoT* and *exoS*, 5 µL of DNA were used, while a small part of the bacterial colony directly in the reaction was used for the *exoY* and *exoU* genes. The reaction was prepared for a final volume of 25 µL, containing ultrapure water, buffer [10x], 1.5 U of Taq DNA polymerase containing MgCl₂ (Promega Corporation), 0.2 mM of dNTP Mix (Promega Corporation), 0.5µM of the specific primers for *exoS*, *exoT*, *exoU*, *exoY*. The amplification reaction conditions were: initial denaturation at 94°C for 3 minutes, 40 denaturation cycles at 94°C for 40 seconds, annealing at 55°C (for *exoS* and *exoY*), 64°C (for *exoU*) and 65.5°C (for *exoT*) for 30 seconds, an extension step at 72°C for 60 seconds, and a final extension at 72°C for 5 minutes. The analysis of the reaction products, electrophoresis and gel documentation were performed as described previously. *P. aeruginosa* PAO1 and PA103 strains were used as controls. The control strains were kindly provided Dr Ana Lúcia da Costa Darini (College Of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo) and Maria Cristina Plotkowski (Rio de Janeiro State University).

Statistical analyses

The student's t-test was used to compare continuous variables, and X² or Fisher's exact tests were used to compare categorical variables. To determine independent risk factors for the

30-day mortality, a multiple logistic regression model was used to control for the effects of confounding variables. Variables at $P \leq 0.05$ in the univariate analysis were candidates for the multivariate analysis. All P values were two tailed, and $P \leq 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

A total of 262 non-repetitive patients presented carbapenem resistant *P. aeruginosa* infections at the University Hospital were identified during this study.

The detailed information on the factors associated with death and the relevant demographics and clinical characteristics of the study population are summarized in Table 1. Previous use of antibiotics (90%), invasive procedures (92.4%), comorbidities (50.8%), and surgery (46.9%) were common among patients presenting infection by carbapenem resistant *P. aeruginosa*. Of the total number of patients, 36.6% died within 30 days of diagnosis, with 17.9% dying within 5 days. A total of 138 (52.7%) patients received inappropriate empirical therapy. Compared to the cohort of patients with infections who died within 30 days, mean patient age was of 60.75 ± 20.94 years old (range 9 month -90 years) and most were from Emergency Room and Clinical Medical wards (45.4% and 27.9%, respectively). Most of the considered risk factors were significant by the univariate analysis. The multivariate analyses results concerning the association between risk factors and 30-day mortality indicate that predictors independently associated with death comprised the presence of comorbidity conditions, such as cancer and heart failure and secondary bacteremia related to the respiratory tract. Regarding patients who died within 5 days of hospitalization, the predictor independently associated with death was the use of a urinary catheter.

The Kaplan–Meier cumulative survival estimates (Figures 1 and 2) for patients with inappropriate versus appropriate therapy indicate that the first group displayed a lower survival probability ($P=0.001$ and $P=0.04$). The 30-day mortality rate for the first group was of 45.6%, and for the second group, 26.6%. The 5-day mortality rate for the first group was of 23.2%, and for second group, 12.1%.

Table 1 - Risk factors associated with 5 and 30-day mortalities in patients with infections caused by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*

Risk Factors	Group 1			Group 2		Univariate Group 1		Univariate Group 2		Multivariate Group 1		Multivariate Group 2	
	Total	Death – 30 days	Survival	Death – 5 days	Survival	OR ¹ (CI95%) ²	P ³	OR ¹ (CI95%) ²	P ³	OR (CI 95%) ²	P ³	OR (CI 95%) ²	P ³
	N=262(%)	N= 96(%)	N= 166(%)	N 47(%)	N=215(%)								
Age-mean	54.58±21.98	60.75±20.94	51.02±21.77	59.2±21.8	53.58±21.93	-	0.0001*	-	0.0535	-	-	-	-
Gender													
Male	182 (69.5)	63 (65.6)	119 (71.7)	31 (66)	151 (70.2)	0.75 (0.43-1.29)	0.3047	0.82 (0.42-1.60)	0.5643	-	-	-	-
Female	80 (30.5)	33 (34.4)	47 (28.3)	16 (34)	64 (29.8)	1.32 (0.77-2.27)	0.3047	1.21(0.62-2.38)	0.5643	-	-	-	-
Length of hospital stay-mean (days)	61.22±49.19	41.02±25.16	72.90±55.54	31.3±23.3	67.75±50.95	-	0.0001*	-	0.0001*	-	-	-	-
Intensive Care Unit	182(69.5)	76 (79.2)	106 (63.9)	37 (78.7)	145 (67.4)	2,15 (1,19-3,86)	0.0095*	1.78 (0.83-3.79)	0.1282	2.02 (0.91-4.43)	0.080	-	-
Length of ICU stay-mean (days)	20.09±19.81	24.26±16.53	20.78±23.12	13.5±13.4	21.67±22.42	-	0.6615	-	0.1000	-	-	-	-
Surgery	121 (46.9)	44 (45.8)	77 (46.4)	23 (48.9)	98 (45.6)	0.97 (0.59-1,61)	0.9312	1.14 (0.60-2.15)	0.6760	-	-	-	-
Invasive Procedures													
Mechanical ventilation	191 (72.9)	80 (83.3)	111 (66.9)	40 (85.1)	151 (70.2)	2.47 (1.32- 4,63)	0.0039*	2.42 (1.03-5.69)	0.0377*	1.17 (0.45-3.01)	0.736	1.02 (0.33 – 3.16)	0.970
Tracheostomy	134(51.1)	48 (50)	86 (51.8)	21 (44.7)	113 (52.5)	0.93 (0.56-1.53)	0.7780	0.72 (0.38-1.37)	0.3277	-	-	-	-
Urinary cateter	181 (69.1)	75 (78.1)	106 (63.9)	42 (89.4)	139 (64.6)	2.02 (1.13-3.60)	0.0160*	4.59 (1.74-12.10)	0.0009*	1.17 (0.55-2.47)	0.677	3.60 (1.22 – 10,59)	0.020*
Central Venous Catheter	213 (81.3)	88 (91.7)	125 (75.3)	46 (97.9)	167 (77.7)	3.60 (1.61-8.07)	0.0011*	13.22 (1.77-98.43)	0.0007*	1.51 (0.49-4.57)	0.465	8.14 (0.87 – 75.98)	0.066
Surgical drain	54 (20.6)	21 (21.9)	33 (19.9)	10 (21.8)	44 (20.5)	1.12 (0.60-2.09)	0.7004	1.05 (0.48-2.27)	0.9009	-	-	-	-
Enteral or gastric nutrition probes	178 (67.9)	79 (82.3)	99 (59.6)	38 (80.6)	140 (65.1)	3,14 (1.71-5.78)	0.0002*	2.26 (1.03-4.92)	0.0363*	1.64 (0.73-3.68)	0.231	0.78 (0.30 – 2.51)	0.626
Hemodialysis	57 (21.7)	31 (32.3)	26 (15.7)	18 (38.3)	39 (18.1)	2.56 (1.41-4.67)	0.0017*	2.80 (1.41-5.54)	0.0024*	1.61 (0.78 – 3.29)	0.192	1.96 (0.87 – 4.44)	0.103
Parenteral Nutrition	25 (9.5)	13 (13.5)	12 (7.2)	9 (19.1)	16 (7.4)	2.01 (0.87-4.60)	0.0938	2.94 (1.21-7.15)	0.0133*	-	-	1.46 (0.53 – 4.01)	0.459

Comorbidity conditions

Heart Failure	52 (19.8)	27 (28.1)	25 (15)	11 (23.4)	41 (19)	2.20 (1.19-4.08)	0.0106*	1.29 (0.60-2.76)	0.4997	2.27 (1.11 – 4.66)	0.025*	-	-
Cancer	35 (13.3)	21 (21.9)	14 (8.4)	11 (23.4)	24 (11.2)	3.04 (1.46-6.31)	0.0021*	2.43 (1.09-5.40)	0.0254*	4.21 (1.77 - 9.967)	0.001*	2.44 (0.99- 6.03)	0.052
Diabetes Mellitus	50 (19.1)	22 (22.9)	28 (16.9)	12 (25.5)	38 (17.7)	1.46 (0.78-2.74)	0.2299	1.59 (0.75-3.35)	0.2143	-	-	-	-
Chronic Renal Failure	33 (12.6)	14 (14.6)	19 (11.4)	9 (19.1)	24 (11.2)	1.32 (0.62-2.77)	0.4608	1.88 (0.81-4.37)	0.1350	-	-	-	-
Lung disease	9 (3.4)	5 (5.2)	4 (2.4)	3 (6.4)	6 (2.8)	2.22 (0.58-8.49)	0.2949	2.37 (0.57-9.86)	0.2062	-	-	-	-
Primary bacteremia	57 (21.7)	29 (30.2)	28 (16.9)	19 (40.4)	38 (17.8)	2.13 (1.17-3.87)	0.0117*	3.16 (1.60-6.23)	0.0006*	1.36 (0.34- 5.32)	0.657	0.64 (0.10-3.84)	0.631
Central Line Catheter related	12 (4.6)	5 (5.2)	7 (4.2)	2 (4.2)	10 (4.6)	1.24 (0.38-4.04)	0.7115	0.91 (0.19- 4.30)	1.0000	-	-	-	-
Unknown	45 (17.8)	24 (25)	21 (12.6)	17 (36.2)	28 (13)	2.39 (1.20-4.41)	0.0107*	3.78 (1.85-7.74)	0.0001*	2.00 (0.48-8.33)	0.338	4.79 (0.78 – 29.47)	0.090
Secondary bacteremia	30 (11.5)	17 (17.7)	13 (7.8)	8 (17)	22 (10.2)	2.53 (1.17-5.47)	0.0156*	1.80 (0.74-4.33)	0.1855	0.86 (0.22 – 3.31)	0.830	-	-
Respiratory tract	16 (6.1)	13 (13.5)	3 (1.8)	5 (10.6)	11 (5.1)	8.51 (2.35-30.71)	0.0002*	2.20 (0.72-6.68)	0.1521	10.83 (1.68 – 69.7)	0.012*	-	-
Pneumonia	99 (37.8)	32 (33.3)	67 (40.4)	13 (27.6)	86 (40)	0.73 (0.43-1.25)	0.2583	0.57 (0.28-1.14)	0.1140	-	-	-	-
Urinary Tract Infection	30 (11.4)	11 (11.4)	19 (11.4)	5 (10.6)	25 (11.6)	1.00 (0.45-2.20)	0.9975	0.90 (0.32-2.50)	1.0000	-	-	-	-
Other sites⁴	46 (17.5)	9 (9.3)	37 (22.3)	3 (6.4)	43 (20)	0.36 (0.16-0.78)	0.0081*	0.27 (0.08-0.92)	0.0324*	1.31 (0.59 – 2.89)	0.499	0.93 (0.35 -2.48)	0.893
Previous antimicrobial	236 (90)	91 (94.8)	145 (87.3)	45 (95.7)	191 (88.8)	2.63 (0.95-7,23)	0.0522	2.82 (0.64-12.41)	0.1861	-	-	-	-
Multiresistance	156 (59.5)	53 (55.2)	103 (62)	28 (59.6)	128 (59.5)	0.68 (0.40-1.16)	0.1632	0.95 (0.49-1.86)	0.8931	-	-	-	-
Inadequate treatment	138 (52.7)	63 (65.6)	75 (45.2)	32 (68)	106 (49.3)	2.31 (1.37-3.89)	0.0014*	2.19 (1.12-4.28)	0.0195*	1.54 (0.83-2.85)	0.164	1.86 (0.87 – 3.97)	0.108

Note: ¹Odds ratio; ²Confidence interval; ³P value; ⁴Ascitic fluid, cavity abscess, wound secretion, ocular secretion, liquor; *Statistically significant P (≤ 0.05)

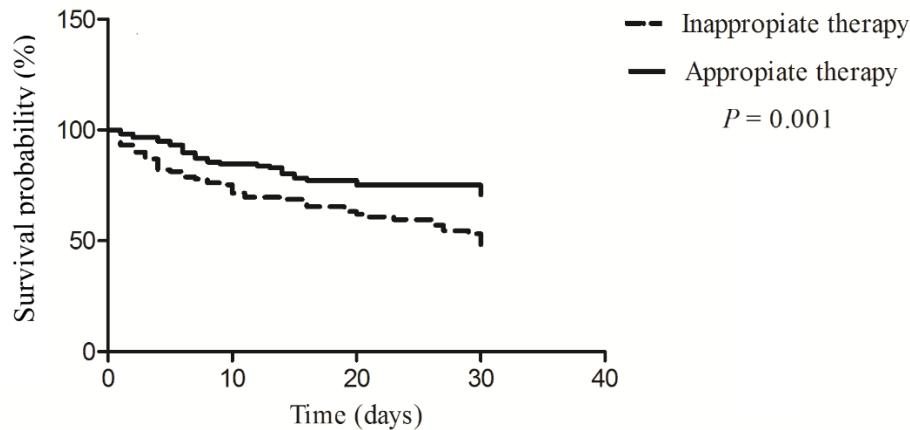


Figure 1: Survival curve (30 days) using the Kaplan–Meier method for patients who received antimicrobial appropriate therapy compared to those who received inappropriate empirical therapy

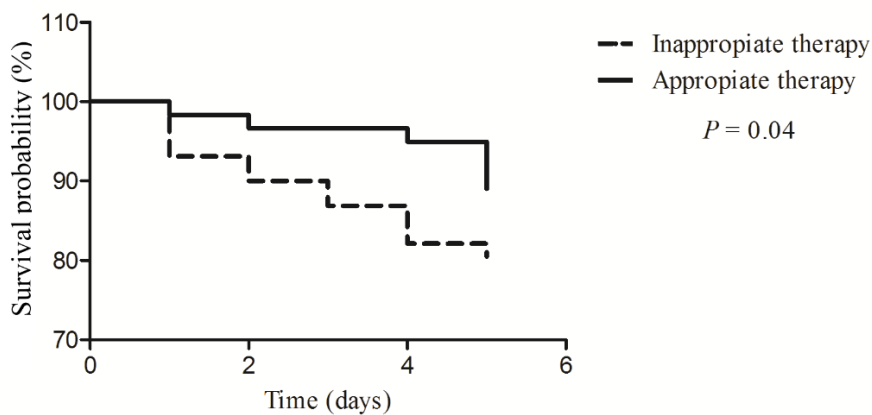


Figure 2: Survival curve (5 days) using the Kaplan–Meier method for patients who received antimicrobial appropriate therapy compared to those who received inappropriate empirical therapy

Table 2 summarizes the characterization of *P. aeruginosa* strains regarding MBL production, resistance profile and T3SS genotype of carbapenem-resistant clinical isolates included in the study. According to the PCR assessments, the T3SS genotype for genes encoding the cytotoxins *ExoU*, *ExoS*, *ExoY* and *ExoT* indicate that 57 (64.8%) of the clinical isolates carried *exoS*, 76 (86.3%) carried *exoT* and 65 (73.9%) carried *exoY*. The *exoS+exoT+exoY* genotype was observed in 42 (47.7%) of the strains. Fifty-two isolates were positive for the two effector genes *exoT* and *exoS* (59%), the *exoU* gene was observed only in 19.3% of the strains, and a low frequency was observed for isolates encoding all four T3SS

genes (9.1%). Of the 15 patients exhibiting *exoU* producing *P. aeruginosa*, 46.7% died and 35.3% were associated with pneumonia (data not shown).

Resistance rates were similar among isolates containing *exoT*, *exoS*, *exoU* and *exoY*, with high resistance frequencies for ciprofloxacin (100%), gentamicine (100%) and cefepime (87.5%). In general, the strains exhibited an MDR profile (75%). Most of the isolates expressing the T3SS genotype exhibited an MDR profile (over 78%). Thus, the important relationship between *exoU* and MDR expression is highlighted since, of the total positive isolates for *exoU*, 76.5% were multiresistant.

MBL multiplex PCR was conducted on 138 carbapenem resistant PA isolates, and 5.1%, 2.2% and 0.7% of the isolates, respectively, presented an amplicon consistent with MBL genes, identified as *bla*_{SPM-1}-type, *bla*_{VIM}-type and *bla*_{IMP}-type.

Table 2. Characterization of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical specimens and relation to metallo- β -lactamase production, Type III Secretion System genotype, resistance profile and virulence factors

Site	Resistant PA ¹ CBP ² /MDR*	Analyzed MBL ⁸ / positive N(%)	PCR ⁹ product size pb/gene (isolates)	Analyzed T3SS ¹⁰ genotype	T3SS profile (isolates)	Resistance profile (%) [#]
Blood	122/62	62/9(14.5%)	271/ <i>bla</i> _{SPM} (6) 390/ <i>bla</i> _{SPM} (3)	25	<i>exoU</i> (5)	FEP ³ (60) GEN ⁴ (80) AMK ⁵ (20) TZP ⁶ (40), FLQ ⁷ (80)
					<i>exoS</i> (21)	FEP ³ (90.5) GEN ⁴ (95.2) AMK ⁵ (52.4) TZP ⁶ (76.2), FLQ ⁷ (100)
					<i>exoT</i> (22)	FEP ³ (81.8) GEN ⁴ (86.3) AMK ⁵ (45.4) TZP ⁶ (68.2), FLQ ⁷ (90.9)
					<i>exoY</i> (20)	FEP ³ (80) GEN ⁴ (85) AMK ⁵ (35) TZP ⁶ (65), FLQ ⁷ (90)
					<i>exoY/exoT/exoU</i> (5)	FEP ³ (60) GEN ⁴ (80) AMK ⁵ (20) TZP ⁶ (40), FLQ ⁷ (80)
					<i>exoY/exoT</i> (17)	FEP ³ (76.6) GEN ⁴ (82.3) AMK ⁵ (35.3) TZP ⁶ (58.8), FLQ ⁷ (88.2)
					<i>exoS/exoT/exoY</i> (14)	FEP ³ (85.7) GEN ⁴ (92.9) AMK ⁵ (42.8) TZP ⁶ (64.3), FLQ ⁷ (100)
					<i>exoS/exoT/exoY/exoU</i> (3)	FEP ³ (66.7) GEN ⁴ (100) AMK ⁵ (33.3) TZP ⁶ (33.3), FLQ ⁷ (100)
Lungs	197/68	55/1(1.8%)	188/ <i>bla</i> _{IMP} (1)	40	<i>exoT</i> (34)	FEP ³ (64.7) GEN ⁴ (69.6) AMK ⁵ (17.6) TZP ⁶ (32.3), FLQ ⁷ (67.6)
					<i>exoY</i> (28)	FEP ³ (67.8) GEN ⁴ (71.4) AMK ⁵ (21.7) TZP ⁶ (32.1), FLQ ⁷ (78.6)
					<i>exoS</i> (23)	FEP ³ (78.3) GEN ⁴ (65.2) AMK ⁵ (17.4) TZP ⁶ (30.4), FLQ ⁷ (78.3)
					<i>exoU</i> (6)	FEP ³ (66.7) GEN ⁴ (50) AMK ⁵ (33.3) TZP ⁶ (33.3), FLQ ⁷ (50)
					<i>exoT/exoS</i> (21)	FEP ³ (80.9) GEN ⁴ (71.4) AMK ⁵ (23.8) TZP ⁶ (33.3), FLQ ⁷ (81)
					<i>exoT/exoY</i> (27)	FEP ³ (66.6) GEN ⁴ (70.4) AMK ⁵ (14.8) TZP ⁶ (33.3), FLQ ⁷ (77.7)
					<i>exoY/exoT/exoS</i> (17)	FEP ³ (76.5) GEN ⁴ (82.3) AMK ⁵ (17.6) TZP ⁶ (29.4), FLQ ⁷ (88.2)
					<i>exoY/exoT/exoU</i> (5)	FEP ³ (60) GEN ⁴ (40) AMK ⁵ (20) TZP ⁶ (40), FLQ ⁷ (40)
<i>exoT/exoY/exoS/exoU</i> (1)	FEP ³ (100) GEN ⁴ (100) AMK ⁵ (100) TZP ⁶ (100), FLQ ⁷ (100)					
Urine	63/32	13/0 -	-	-	<i>exoU</i> (4)	FEP ³ (100) GEN ⁴ (75) AMK ⁵ (25) TZP ⁶ (100), FLQ ⁷ (100)

				<i>exoS</i> (7)	FEP ³ (71.4) GEN ⁴ (57.1) AMK ⁵ (28.6) TZP ⁶ (71.4), FLQ ⁷ (71.4)	
				<i>exoT</i> (12)	FEP ³ (66.7) GEN ⁴ (66.7) AMK ⁵ (16.7) TZP ⁶ (66.7), FLQ ⁷ (75)	
				<i>exoY</i> (11)	FEP ³ (63.6) GEN ⁴ (81.8) AMK ⁵ (27.3) TZP ⁶ (72.7), FLQ ⁷ (81.8)	
			14	<i>exoT/exoY</i> (10)	FEP ³ (60) GEN ⁴ (80) AMK ⁵ (20) TZP ⁶ (70), FLQ ⁷ (80)	
				<i>exoT/exoY/exoU</i> (3)	FEP ³ (100) GEN ⁴ (100) AMK ⁵ (33.3) TZP ⁶ (100), FLQ ⁷ (100)	
				<i>exoT/exoS/exoU</i> (3)	FEP ³ (100) GEN ⁴ (66.7) AMK ⁵ (33.3) TZP ⁶ (100), FLQ ⁷ (100)	
				<i>exoT/exoY/exoS</i> (6)	FEP ³ (66.7) GEN ⁴ (66.7) AMK ⁵ (33.3) TZP ⁶ (66.7), FLQ ⁷ (66.7)	
				<i>exoT/exoY/exoS/exoU</i> (2)	FEP ³ (100) GEN ⁴ (100) AMK ⁵ (50) TZP ⁶ (100), FLQ ⁷ (100)	
Others*	89/36	7/1 (14.3%)	271/ <i>bla</i> _{SPM} (1)	<i>exoS</i> (6)	FEP ³ (83.3) GEN ⁴ (83.3) AMK ⁵ (0) TZP ⁶ (66.7), FLQ ⁷ (83.3)	
				<i>exoT</i> (7)	FEP ³ (71.4) GEN ⁴ (85.7) AMK ⁵ (14.3) TZP ⁶ (57.1), FLQ ⁷ (85.7)	
				<i>exoU</i> (2)	FEP ³ (100) GEN ⁴ (100) AMK ⁵ (0) TZP ⁶ (50), FLQ ⁷ (100)	
			8	<i>exoY</i> (5)	FEP ³ (100) GEN ⁴ (100) AMK ⁵ (0) TZP ⁶ (80), FLQ ⁷ (100)	
				<i>exoS/exoY</i> (5)	FEP ³ (100) GEN ⁴ (100) AMK ⁵ (0) TZP ⁶ (80), FLQ ⁷ (100)	
				<i>exoT/exoS</i> (6)	FEP ³ (83.3) GEN ⁴ (83.3) AMK ⁵ (0) TZP ⁶ (66.7), FLQ ⁷ (83.3)	
				<i>exoT/exoY/exoS</i> (5)	FEP ³ (100) GEN ⁴ (100) AMK ⁵ (0) TZP ⁶ (80), FLQ ⁷ (100)	
				<i>exoT/exoY/exoS/exoU</i> (2)	FEP ³ (100) GEN ⁴ (100) AMK ⁵ (0) TZP ⁶ (50), FLQ ⁷ (100)	
Catheter tip	23/16	1/0 -	-	1	<i>exoT</i> (1)	FEP ³ (0) GEN ⁴ (0) AMK ⁵ (0) TZP ⁶ (0), FLQ ⁷ (0)
					<i>exoY</i> (1)	FEP ³ (0) GEN ⁴ (0) AMK ⁵ (0) TZP ⁶ (0), FLQ ⁷ (0)
					<i>exoT/exoY</i> (1)	FEP ³ (0) GEN ⁴ (0) AMK ⁵ (0) TZP ⁶ (0), FLQ ⁷ (0)

Note: *Wound secretion (6); Ear secretion (1); Tissue fragment (1); ¹*Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical specimens; ²CBP: carbapenemics; ³FEP: Cefepime; ⁴GEN: Gentamicin; ⁵AMK: Amikacin; ⁶PPT: Piperacillin-Tazobactam; ⁷FLQ: Fluoroquinolonas; ⁸Metallo-beta-lactamase; ⁹Polymerase chain reaction; ¹⁰Type three secretion system *Resistance profile of isolates expressing the T3SS gene. # number of resistant multidrug isolates.

DISCUSSION

According to the literature, relationships between antimicrobial resistance and virulence traits and how they may impact the outcome of bacterial infections are a subject of growing interest [4,16,25-27]. *P. aeruginosa* is considered one of the most problematic pathogens among Gram-negative bacteria that cause hospital infections, especially due to its extraordinary ability to acquire resistance genes and virulence [25,28].

Resistance to carbapenems has become an increasing and important problem, particularly in Latin America. The current panorama of antibiotic therapy is restricted to therapeutic alternatives with drugs considered problematic due to their high toxicity, such as polymyxins B and colistin, which are often not commercially available in Brazil [7,29-31]. Inappropriate empirical therapy was considered a risk factor for increased mortality. Individuals undergoing inappropriate empirical therapy were up to 2.31-fold more likely to die when compared to patients who received adequate treatment. This has also been reported by other authors, i.e. Matos et al. [12], Aviv et al. [32], Osih et al. [33] and Bogan et al. [34].

Literature reviews have indicated mortality frequencies caused by carbapenem resistant *P. aeruginosa* ranging from 47.3% to 70%, with studies from Brazil included [12,28] and in about 23% of all studies carried out in the US [35], highlighting antimicrobial resistance, inappropriate empirical therapy and the severity of underlying diseases as risk factors for worse patient evolution [12,32,36,37]. Using these data as basis, the rates are considered high in the assessed center in Brazil. The use of urinary catheters and the presence of comorbidity conditions, such as secondary bacteremia related to the respiratory tract, were independent risk factors associated with death for 5 and 30-days mortality. These results are in agreement with data from other Brazilian studies [12,36].

Numerous factors may make these patients more vulnerable to microorganism acquisition and infection which could, in turn, lead to mortality. Furthermore, the acquisition of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the hospital could be responsible for the deterioration of the patients' clinical condition [12,38].

Although the prevalence of MBL as a resistance mechanism has increased, particularly in Latin America, also associated with severe infections, the results reported herein indicate that, although a relatively high number of the carbapenem-resistant *P. aeruginosa* was detected, strains encoding these enzymes was extremely low (8% of all strains), independent of genotype. Our results also reveal an important change in the epidemiology of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* isolates at the HC-UFU since 2005, in which only SPM-1 producing isolates were found [39], and 2011, reporting the emergence and dissemination of MBL-

producing isolates of the VIM type. Currently, no MBL genes were detected in 92% (127/138) of the isolates, although further research should be carried out in order to determine exact resistance mechanisms. Contrary to what was reported by Hosein et al. (2019) in Iran, 64.3% of *P. aeruginosa* isolates recovered from infections exhibited an MBL profile, with *bla_{IMP}* as the most frequent genotype [10]. Since the frequency of multidrug-resistant strains was high in the present study, these results suggest that other resistance mechanisms coexist in these strains, such as efflux pumps and membrane impermeability, which were not evaluated.

Functional T3SS has been associated with worse clinical outcomes and higher mortality rates in patients with *P. aeruginosa* infections, and approximately 70% of clinical strains contain the *exoS*-encoding gene [25,40]. In this study, the *exoS* gene was detected in 64.7% of the clinical isolates, while the presence of the *exoT* and *exoY* genes varied and, unlike other studies [17,19,25,40], *exoU* genes occurred at a low, but significant, frequency (19.5%).

The relationship between multidrug resistance and *exoU*-producing strains is evident in the literature [26,28,41,42]. We also investigated the potential association between T3SS genotypes and resistance profiles. Interestingly, we found that the *exoU* genotype was significantly more frequent among MDR strains.

As expected, *exoT* and *exoY* genes were detected in the vast majority of all strains, but the presence of *exoS* and *exoU* was almost mutually exclusive. Overall, 64.8% of the strains were *exoS*⁺ and 19.3%, *exoU*⁺. Our findings are, therefore, in agreement with previous studies demonstrating that *exoU*⁺, ranging from 10% to 40%, is less frequent than *exoS*⁺ (60% to 90%) among *P. aeruginosa* clinical strains [19,25,28,40].

Our study presents some limitations. First, this is a retrospective study conducted in a single tertiary care hospital in the Brazil. Therefore, the results may not be generalized to other institutions and/or countries. However, we believe that a single center study design is preferred when studying the sole effect of inadequate treatment above other patient- and care-related risk factors. Second, it is easier to collect data and clinical isolates for analysis and attempt to determine endemic strains in studies conducted in a single hospital. One of the strengths of our study is that, despite being a single center study, a large group of patients was evaluated.

In conclusion, our results present evidence of an important change in the epidemiology of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* isolates in a Brazilian hospital regarding MBL production, with low detection of SPM and VIM, inferring the participation and co-existence of other resistance mechanisms in these strains. Additionally, genes from the T3SS were detected in most isolates, revealing their virulence potential and their relationship with the MDR profile, which, combined with inappropriate empirical therapy, is a crucial factor

concerning the worse prognosis among patients with infection caused by MDR *P. aeruginosa*, especially those who died within 5 days of diagnosis. These results should encourage a reassessment of empirical antibiotic use guidelines in institutions, as well as a new approach to predict MDR *P. aeruginosa* infections.

Acknowledgments

The authors would like to thank Dr Ana Lúcia da Costa Darini (College Of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo) and Maria Cristina Plotkowski (Rio de Janeiro State University), who kindly provided the control PAO1 and PA103 strains, respectively.

Funding sources

This research received funding from public agencies dedicated to the promotion of scientific and technological research, as follows: Minas Gerais State Agency for Research and Development (FAPEMIG)/PPSUS (Nº [APQ-04062-17](#)) and National Council for Scientific and Technological Development (CNPQ). (Nº 428397/2018-2).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Ethical approval

The research was approved by the Federal University of Uberlandia Committee of Ethics in Research with Human Participants (Approval No. 2.527.621).

References

- [1] Montero MM, López Montesinos I, Knobel H, Molas E, Sorlí L *et al.* Risk Factors for Mortality among Patients with *Pseudomonas aeruginosa* Bloodstream Infections: What Is the Influence of XDR Phenotype on Outcomes? *J Clin Med* 2020; 9:514. doi: <https://doi.org/10.3390/jcm9020514>
- [2] Garcia-Vidal C, Cardozo-Espinola C, Puerta-Alcalde P, Marco F, Tellez A *et al.* Risk factors for mortality in patients with acute leukemia and bloodstream infections in the era of multiresistance. *PLoS One* 2018; 13: e0199531. doi:10.1371/journal.pone.0199531.
- [3] Sader HS, Castanheira M, Duncan LR, Flamm RK. Antimicrobial susceptibility of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates from United States medical centers stratified by infection type: results from the International Network for Optimal

- Resistance Monitoring (INFORM) surveillance program. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2018; 92:69-74. doi: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.04.012>. 8.
- [4] Shahrbanou IPJ, Jalal M, Asghar S, Vahid P, Abbas BB *et al*. Occurrence of a multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains in hospitalized patients in southwest of Iran: Characterization of resistance trends and virulence determinants. *Jundishapur Journal of Microbiology* 2018; 11: e57341. doi: 10.5812/jjm.57341
- [5] Walkty A, Lagace-Wiens P, Adam H, Baxter M, Karlowsky J *et al*. Antimicrobial susceptibility of 2906 *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates obtained from patients in Canadian hospitals over a period of 8 years: Results of the Canadian Ward surveillance study (CANWARD), 2008 –2015. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2017; 87:60-63. doi: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.10.003>. 7.
- [6] Ponce de Leon A, Merchant S, Raman G, Avendano E, Chan J *et al*. *Pseudomonas* infections among hospitalized adults in Latin America: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis* 2020 27; 20:250. doi: 10.1186/s12879-020-04973-0.
- [7] Balkhair A, Al-Muharrmi Z, Al'Adawi B, Al Busaidi I, Taher HB, *et al*. Prevalence and 30-day all-cause mortality of carbapenem-and colistin-resistant bacteraemia caused by *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella pneumoniae*: Description of a decade-long trend. *Int J Infect Dis* 2019; 85: 10–15. doi: 10.1016/j.ijid.2019.05.004.
- [8] Jácome PRLA, Alves LR, Jácome-Júnior AT, Silva MJBD, Lima JLDC, *et al*. Detection of blaSPM-1, blaKPC, blaTEM and blaCTX-M genes in isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. and *Klebsiella* spp. from cancer patients with healthcare-associated infections. *J Med Microbiol* 2016; 65:658–665. doi: 10.1099/jmm.0.000280.
- [9] Baumgart AM, Molinari MA, Silveira AC. Prevalence of carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in high complexity hospital. *Braz J Infect Dis* 2010; 14:433-436. doi: 10.1590/s1413-86702010000500002.
- [10] Sharifi H, Pouladfar G, Shakibaie MR, Pourabbas B, Mardaneh J *et al*. Prevalence of β -lactamase genes, class 1 integrons, major virulence factors and clonal relationships of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitalized patients in southeast of Iran. *Iran J Basic Med Sci* 2019; 22:806-812. doi:10.22038/ijbms.2019.35063.8340.
- [11] Quiles MG, Carlesse F, da Silva MA, Mingrone RC, Fonseca JM, *et al*. High mortality outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection in a Brazilian pediatric oncology hospital. *Braz J Infect Dis* 2017; 21:205–206. doi: 10.1016/j.bjid.2016.10.012.
- [12] Matos EC, Matos HJ, Conceição ML, Rodrigues YC, Carneiro IC, *et al*. Clinical and microbiological features of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* in patients hospitalized in intensive care units. *Rev Soc Bras Med Trop* 2016; 49:305-311. doi: 10.1590/0037-8682-0446-2015.

- [13] Babich T, Naucler P, Valik JK, Giske CG, Benito N, *et al.* Ceftazidime, carbapenems, or piperacillin-tazobactam as single definitive therapy for *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection - a multi-site retrospective study. *Clin Infect Dis* 2020; 70:2270-2280. doi:10.1093/cid/ciz668.
- [14] Engel J, Balachandran P. Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. *Curr Opin Microbiol* 2009; 12:61–66. doi: 10.1016/j.mib.2008.12.007.
- [15] Hauser AR. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7:654–665. doi: 10.1038/nrmicro2199.
- [16] Takata I, Yamagishi Y, Mikamo H. Association of the exoU genotype with a multidrug non susceptible phenotype and mRNA expressions of resistance genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Chemother* 2018; 24:45-52. doi: 10.1016/j.jiac.2017.08.018.
- [17] El-Solh AA, Hattemer A, Hauser AR, Alhajhusain A, Vora H. Clinical outcomes of type III *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. *Crit Carte Med* 2012; 40:1157-63. doi: 10.1097/CCM.0b013e3182377906.
- [18] Khodayary R, Nikokar I, Mobayen MR, Afrasiabi F, Araghian A *et al.* High incidence of type III secretion system associated virulence factors (exoenzymes) in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Iranian burn patients. *BMC Res Notes* 2019; 12:28. doi: 10.1186/s13104-019-4071-0.
- [19] Ferreira ML, Dantas RC, Faria ALS, Gonçalves IR, Silveira de Brito C, *et al.* Molecular epidemiological survey of the quinolone- and carbapenem-resistant genotype and its association with the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol* 2015; 64:262-271. doi: 10.1099/jmm.0.000023.
- [20] Gilbert DN, Sande MA, Moellering RC, Eliopoulos GM. *The Sanford guide to antimicrobial therapy* 2007. Sperryville, VA: Antimicrobial Therapy Incorporated, 37th ed., 2007.
- [21] Daikos GL, Tsaousi S, Tzouveleki LS, Anyfantis I, Psychogiou M, *et al.* Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections: lowering mortality by antibiotic combination schemes and the role of carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 5:2322-8. doi: 10.1128/AAC.02166-13.
- [22] Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18:268–281. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.
- [23] Woodford, N. Rapid characterization of b-lactamases by multiplex PCR. *Methods Mol Biol* 2010; 642:181–192. doi: 10.1007/978-1-60327-279-7_14.
- [24] Jabalameli F, Mirsalehian A, Khoramian B, Aligholi M, Khoramrooz SS, *et al.* Evaluation of biofilm production and characterization of genes encoding type III secretion system among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *Burns* 2012; 38:1192–1197. doi: 10.1016/j.burns.2012.07.030.
- [25] Khodayary R, Nikokar I, Mobayen MR, Afrasiabi F, Araghian A, *et al.* High incidence of type III secretion system associated virulence factors (exoenzymes)

in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Iranian burn patients. *BMC Res Notes* 2019; 12:28. doi: 10.1186/s13104-019-4071-0.

[26] Subedi D, Vijay AK, Kohli GS, Rice SA, Willcox M. Association between possession of ExoU and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* 2018; 13:e0204936. doi: 10.1371/journal.pone.0204936.

[27] Morrow KA, Ochoa CD, Balczon R, Zhou C, Cauthen L, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* exoenzymes U and Y induce a transmissible endothelial proteinopathy. *Am J Physiol Lung Cell Mol* 2016; 310:L337-53. doi: 10.1152/ajplung.00103.2015.

[28] Aditi, Shariff M, Chhabra SK, Rahman MU. Similar virulence properties of infection and colonization associated *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol* 2017; 66:1489–1498. doi: 10.1099/jmm.0.000569.

[29] Dias VC, Resende JA, Bastos AN, De Andrade Bastos LQ, De Andrade Bastos VQ, *et al.* Epidemiological, physiological and molecular characteristics of a brazilian collection of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Drug Resist* 2017; 23:852-863. doi: 10.1089/mdr.2016.0219.

[30] Potron A, Poirel L, Nordmann P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Int J Antimicrob Agents* 2015; 45:568-85. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2015.03.001.

[31] Gales AC, Castanheira M, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008–2010). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012; 73:354–360. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2012.04.007.

[32] Aviv T, Lazarovitch T, Katz D, Zaidenstein R, Dadon M, *et al.* The epidemiological impact and significance of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: a matched case–case-control analysis. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2018; 39:1262-1265. doi: 10.1017/ice.2018.181.

[33] Osih RB, McGregor JC, Rich SE, Moore AC, Furuno JP, *et al.* Impact of empiric antibiotic therapy on outcomes in patients with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51:839-44. doi: 10.1128/AAC.00901-06.

[34] Bogan C, Kaye KS, Chopra T, Hayakawa K, Pogue JM, *et al.* Outcomes of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae isolation: matched analysis. *Am J Infect Control* 2014; 42:612-20. doi: 10.1016/j.ajic.2014.02.013.

[35] Britt NS, Ritchie DJ, Kollef MH, Burnham CA, Durkin MJ, *et al.* Importance of site of infection and antibiotic selection in the treatment of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* sepsis. *Antimicrob Agents Chemother* 2018; 62:pii: e02400-17. doi: 10.1128/AAC.02400-17.

[36] Dantas RC, Ferreira ML, Gontijo-Filho PP, Ribas RM. *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia: independent risk factors for mortality and impact of resistance on outcome. *J Med Microbiol* 2014; 63:1679-87. doi: 10.1099/jmm.0.073262-0.

[37] Joo EJ, Kang CI, Ha YE, Park SY, Kang SJ, *et al.* Impact of inappropriate empiric antimicrobial therapy on outcome in *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia: a stratified

analysis according to sites of infection. *Infection* 2011; 39:309-18. doi: 10.1007/s15010-011-0124-6.

[38] Peng Y, Bi J, Shi J, Li Y, Xiaofeng X, *et al.* Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections pose growing threat to health care associated infection control in the hospitals of Southern China: A case-control surveillance study. *Am J Infect Control* 2014; 42:1308-1311. doi: 10.1016/j.ajic.2014.08.006.

[39] Cezário RC, Duarte De Morais L, Ferreira JC, Costa-Pinto RM, da Costa Darini AL, *et al.* Nosocomial outbreak by imipenem-resistant metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in an adult intensive care unit in a Brazilian teaching hospital. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2009; 27:269-274. doi: 10.1016/j.eimc.2008.09.009.

[40] Horna G, Amaro C, Palacios A, Guerra H, Ruiz J. High frequency of the exoU+/exoS+ genotype associated with multidrug-resistant “high-risk clones” of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Peruvian hospitals. *Sci Rep* 2019; 9:10874. doi: 10.1038/s41598-019-47303-4.

[41] Cho HH, Kwon KC, Kim S, Koo SH. Correlation between virulence genotype and fluoroquinolone resistance in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Annals Lab Med* 2014; 34:286–92. doi: 10.3343/alm.2014.34.4.286.

[42] Agnello M, Wong-Beringer A. Differentiation in quinolone resistance by virulence genotype in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* 2012; 7:e42973. doi: 10.1371/journal.pone.0042973.

Capítulo III

Artigo 2

The rising problem of hospital antimicrobial resistance and the challenges of Antibiotic Prescription in Brazil

Jane Eire Urzedo^a, Ralciane de Paula Menezes^b, Paulo Pinto Gontijo-Filho^a, Rosineide Marques Ribas^{a**}

Institute of Biomedical Sciences (ICBIM), Laboratory of Molecular Microbiology, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Minas Gerais, Brazil^a.

Technical School of Health (ESTES), Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Minas Gerais, Brazil^b.

****Corresponding author.**

Present address: Av. Pará, 1720, 38400-902, Uberlândia, MG, Brazil

Contact: +55 34 3225 8574

E-mail address: rosi_ribas@yahoo.com.br (R.M. Ribas).

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Intensive care unit; antimicrobial resistance; antibiotic utilization; Brazil

Funding:

This research was supported by the [Minas Gerais State Agency for Research and Development (FAPEMIG)/PPSUS] under Grant [N° APQ-04062-17]; [National Council for Scientific and Technological Development - CNPQ] under Grant [N° 428397/2018-2]. This communication was based on observations and reflections about *Pseudomonas aeruginosa* infections during studies supported by the funding agencies.

Notes on contributors:

Jane Eire Urzedo: Nurse at the Hospital Infection Control Service in Clinical Hospital of the Federal University of Uberlândia, with specialization in Nursing in Neopediatric Intensive Care. Currently, I'm a Phd student in the Postgraduate Program in Health Sciences at the Federal University of Uberlândia.

Ralciane de Paula Menezes: Biomedical and PhD in Health Science from the Federal University of Uberlândia. Currently, I'm responsible for the Laboratory of the Technical Course of Clinical Analysis of the Technical School of Health of the Federal University of Uberlândia. I develop research in the area of Microbiology, with an emphasis on the epidemiology of invasive infections, molecular epidemiology, virulence factors and susceptibility to antimicrobials.

Paulo Pinto Gontijo-Filho: He is currently Full Professor at the Federal University of Uberlândia, He has experience in the field of Medicine, with an emphasis on Infectious and Parasitic Diseases, acting mainly on the following topics: hospital infection, neonatal ICU, colonization and adult ICU. Recently he has participated in new lines of research involving mechanisms of resistance to antimicrobials, study of biofilms and sequencing of bacterial genomes.

Rosineide Marques Ribas: Biologist and PhD in Applied Immunology and Parasitology by the Federal University of Uberlândia. She is currently an associate professor at the Federal University of Uberlândia with experience in the area of Microbiology, emphasis on classical and molecular epidemiology of epidemiologically important microorganisms that cause outbreaks.

Dear editor,

Over the years, became worryingly the overuse and misuse of antimicrobials to the hospital setting, particularly in lower and middle-income countries (LMICs) where antibiotic utilization has increased the most in recent years and where there is the greatest inappropriate use¹.

The hospital microbiota has been modulated over decades mainly by the use of the most prescribed antibiotics, a factor that favors the appearance of increasingly elaborate resistance mechanisms, which can contribute to the permanence and adaptation of microorganisms in the hospital environment². Although there is still limited knowledge regarding on the impact of antimicrobial consumption in different environments, scientists have made important progress in the detailed mechanisms which has contributed to the establishment of these resistant microorganisms.

A rising number of scientific articles have shown that, in Brazil, a country with continental dimensions, the problems of assisted population and lack of available resources, as well as extremely high frequencies of bacterial resistance in hospitals of tertiary care lead significant problem and a challenge of the patient treatment. Making this situation even worse, antibiotic therapy in these hospitals is commonly overused and often little judicious^{3,4,5}.

In this scenario, studies that seek to establish the relationship between the indiscriminate use of antimicrobials and the selection of resistant isolates has gained notoriety among researcher and hospital staff. In recent years, antibiotic therapy has collapsed due to the emergence of new and comprehensive resistance mechanisms in different species of epidemiologically important bacteria, in response to the widespread use of the latest generation of antibiotics. Among Gram-negative, the problem is very significant due to the emergence of resistance to carbapenems (imipenem, meropenem, ertapenem), which is considered a global clinical and epidemiological emergency^{1,2}.

A recent article in the present journal touched the problem. Popovic and collaborators (2020)⁶ conducted a retrospective, non-interventional, single-centre study was conducted covering the period between 1st January 2014 and 31st December 2018, for the monitoring of antimicrobial resistance and consumption of antibacterials in the Intensive Care Unit in northern Serbia. According to with study the results demonstrated the extensive use of broad-spectrum antimicrobial agents, together with high resistance rates among the Gram-negative bacteria surveilled. Even more worrying was the correlation found between antibiotic

prescription and resistance for several combinations of antimicrobial drugs and microorganisms, confirming the indirect influence of selection pressure of different antibiotics to antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria⁶.

In a study published by our research group involving 35 adult Intensive Care Units located south-eastern Brazil, were observed alarming data on antibiotic use in Brazilian Intensive Care Units, with high rates of acquired infections and high rates of antibiotic use (62%), mainly in the patients underwent empirical treatment (68.6%)⁴.

The results suggest that the problem of high antimicrobial resistance and infections related to health care (HAI) caused by multi-resistant microorganisms are complex a catastrophe for global security. Recent publications from Brazil, have shown worrying results associated with inappropriate empirical therapy and multidrug-resistant organisms as risk factors for worse patient evolution^{3,5,7} and as a consequence, this inappropriate antibiotic prescribing widely contributing with increased morbidity, mortality and health care costs².

The outlook today in hospitals across the country is bleak. In Brazil, after almost three decades of official regulation of HAI control, several initiatives have been developed to institute HAI control and prevention, but few initiatives have been made to identify its magnitude⁴ and HAI caused by multi-resistant organisms on in country is out of control.

From all that has been said, we can reach a fundamental conclusion: quantifying the impact of HAIs, especially those caused by multi-resistant bacteria, and defining the infrastructure for their prevention and control, including the rational use of antimicrobials in different contexts, is a challenge that is far from being achieved in Brazil.

References

1. Ponce de Leon A, Merchant S, Raman G, Avendano E, Chan J, Tepichin Hernandez G, et al. *Pseudomonas* infections among hospitalized adults in Latin America: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis.* 2020;20(1):250. doi: 10.1186/s12879-020-04973-0.
2. Horcajada JP, Montero M, Oliver A, Sorlí L, Luque S, Gómez-Zorrilla S, et al. Epidemiology and Treatment of Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Clin Microbiol Rev.* 2019;32(4):e00031-19. doi: 10.1128/CMR.00031-19.
3. Santos ICO, Pereira de Andrade NF, da Conceição Neto OC, da Costa BS, de Andrade Marques E, Rocha-de-Souza CM, et al. Epidemiology and antibiotic resistance trends in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Rio de Janeiro - Brazil: Importance of mutational mechanisms over the years(1995-2015). *Infect Genet Evol.* 2019;73:411-415. doi: 10.1016/j.meegid.2019.05.015.

4. Braga IA, Campos PA, Gontijo-Filho PP, Ribas RM. Multi-hospital point prevalence study of healthcare-associated infections in 28 adult intensive care units in Brazil. J Hosp Infect. 2018;99(3):318-324. doi: 10.1016/j.jhin.2018.03.003.
5. Quiles MG, Carlesse F, Da Silva MA, Mingrone RC, Fonseca JM, Silva DC, et al. High mortality outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection in a Brazilian pediatric oncology hospital. Braz J Infect Dis. 2017; 21(2):205-206. doi: 10.1016/j.bjid.2016.10.012.
6. Popović R, Tomić Z, Tomas A, Anđelić N, Vicković S, Jovanović G, et al. Five-year surveillance and correlation of antibiotic consumption and resistance of Gram-negative bacteria at an intensive care unit in Serbia. J Chemother. 2020;23:1-10. doi: 10.1080/1120009X.2020.1755588.
7. Araujo BF, Ferreira ML, Campos PA, Royer S, Batistão DW, Dantas RC, et al. Clinical and Molecular Epidemiology of Multidrug-Resistant *P. aeruginosa* Carrying aac(6)-Ib-cr, qnrS1 and blaSPM Genes in Brazil. PLoS One. 2016; 11(5):e0155914. doi: 10.1371/journal.pone.0155914. PMID: 27219003; PMCID: PMC4878783.

Conflicts of Interest: The authors report no conflict of interest.

Ethical approval: Not required.

Capítulo IV

Artigo 3

Bloodstream infection caused by carbapenem-resistant *P. aeruginosa*: impact of inappropriate empirical therapy in a referral hospital in Brazil

Running Head: Bloodstream infection: inappropriate empirical therapy

Jane Eire Urzedo^a Msc, Ralciane de Paula Menezes^b PhD, Melina Lorraine Ferreira^a PhD, Cristiane Silveira de Brito^a PhD, Raquel Cristina Cavalcanti Dantas^c PhD, Paulo P. Gontijo-Filho^a PhD, Rosineide Marques Ribas^{a#} PhD

Institute of Biomedical Sciences (ICBIM), Laboratory of Molecular Microbiology, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Minas Gerais, Brazil^a.

Technical School of Health (ESTES), Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Minas Gerais, Brazil^b.

Biotechnology Institute (IBTEC), Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Minas Gerais, Brazil^c.

#Corresponding author: Rosineide Marques Ribas

Email: rosi_ribas@yahoo.com.br

Phone: +55 (34) 3225 8574

Address: Av. Pará, 1720, Umuarama, Uberlândia MG, 38405-320, Brazil.

Word count: 1158 excluding acknowledgment of financial support and potential conflicts of interest.

ABSTRACT

This study included 87 patients who BSI by carbapenem-resistant *P. aeruginosa*. 61% received inappropriate empirical therapy, the 30-day mortality rate was 57.5%. Inappropriate antibiotic therapy contributed to the increase in mortality. These informations that will assist physicians in adopting more effective approaches for treating BSI by carbapenem-resistant *P. aeruginosa*.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Carbapenem resistance, inappropriate empirical therapy, bloodstream infection, mortality.

Introduction

The high prevalence of infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* has increased the morbimortality over the past decade, especially among hospitalized patients in less developed countries such as Brazil. The problem is greater in large hospitals with many beds complex care levels.^{1,2}

Treatment of bloodstream infection (BSI) in the resource-limited country is largely empirical and a challenge for patients with infections for multidrug-resistant (MDR) *P. aeruginosa*. These patients had limited treatment options and are highly vulnerable to receiving inappropriate empiric therapy, which contributes to increased length of hospitalization and worst clinical outcomes.^{1,3}

The increasing burden of hospital-acquired BSI caused by MDR pathogens has been previously observed in Brazil.² However, only a few studies had examined the impact of inappropriate antimicrobial therapy on the outcomes of patients who had BSI caused by *P. aeruginosa*. Thus, this study aims to evaluate and to identify the predictors of mortality in patients with BSI by carbapenem-resistant *P. aeruginosa* in a Brazilian tertiary hospital.

Methods

Study design, Patients and setting

A cohort study was employed to identify the predictors of mortality at the period of 2009 to 2019, and the impact of inappropriate empirical therapy on the outcomes of patients with BSI by carbapenem-resistant *P. aeruginosa*. Clinical and demographic information about each patient was obtained from hospital records.

This study was carried out at the Clinical Hospital of Federal University of Uberlândia, Brazil, a tertiary-care hospital. The clinical microbiology laboratory database was reviewed, and 87 patients who had BSI by carbapenem-resistant *P. aeruginosa* were identified. Only the first episode of infection was analyzed. The strains that showed intermediate susceptibility were considered resistant and the following antimicrobials tested were: piperacillin/tazobactam, gentamicin, amikacin, cefepime, ciprofloxacin, colistin, imipenem and meropenem.

Antimicrobial therapy was considered inappropriate when the patient was given antimicrobials that did not present "in vitro" activity and/or when treatment was started over 48 hours after diagnosis of infection.⁴ Multidrug resistance was defined as acquired non-susceptibility to at least one agent belonging to three or more antimicrobial categories.⁵

Statistical analysis

Student's t-test was used to compare continuous variables and χ^2 or Fisher's exact tests to compare categorical variables. To determine independent risk factors for 30-day mortality, a multiple logistic regression model was used to control for the effects of confounding variables. A survival curve was constructed using the Kaplan–Meier method. *P* values of ≤ 0.05 were considered statistically significant.

Ethical approval

The research was approved by the Federal University of Uberlandia Committee of Ethics in Research with Human Participants (Approval No. 2.527.621).

Results

Among patients with BSI by carbapenem-resistant *P. aeruginosa* was observed a high Intensive Care Unit (ICU) admission rate (63.2%). The previous use of antibiotics and central venous catheter use was common, with 87.3% and 88.5%, respectively and 53 patients received inadequate treatment empirical, and the 30-days mortality rate was 57.5% (Table 1).

Table 1: Univariate and multivariate analysis of factors associated with the mortality of 87 patients with bloodstream infection caused by Carbapenem Resistant *P. aeruginosa*

Characteristics	Total N=87(%)	Outcome		Statistical analysis			
		Death 30days N=50(%)	Discharge N=37(%)	Univariate OR ¹ (IC ² 95%)	P ³	Multivariate OR ¹ (IC ² 95%)	P ³
Mean age in years (DS)	57.12±20.5	60.2± 20.7	52.9±19.6		0.0295*		--
Male Sex	58 (66.7)	32 (64)	26 (70.3)		0.5396		--
Length of hospital stay-mean (days)	63.6±57.6	41.6±31.1	87±68.1		0.0007*		--
Intensive Care Unit	55 (63.2)	35 (70)	20 (54)		0.1273		--
Length of ICU stay-mean (days)	18.66±23.63	23.1±17.9	40.8±28.5		0.9158		--
Days at risk (time from admission to BSI)	38.71±37.36	34.4±28.9	44.7±46		0.5278		--
Hospitalization during summer months	37 (42.5)	17 (34)	20 (54)		0.0614		--
Comorbidity/ Underlying disease	52 (59.8)	38 (76)	14 (37.8)		0.0030*		0.3117
Heart Failure	21 (24.1)	15 (30)	6 (16.2)		0.1374		--
Cancer	14 (16.1)	13 (26)	1 (2.7)		0.0031*		0.7225
Diabetes Mellitus	13 (15)	10 (20)	3 (8.1)		0.1428		--
Chronic Renal Failure	20 (23)	14 (28)	6 (16.2)		0.1965		--
Lung disease	5 (5.7)	3 (6)	2 (5.4)		1.000		--
Invasive devices							
Central venous catheter	77 (88.5)	46 (92)	31 (83.8)		0.3128		--
Vesical cateter	63 (72.4)	39 (78)	24 (64.9)		0.1754		--
Mechanical ventilation	64 (73.6)	38 (76)	26 (70.3)		0.5491		--
Probes enteral or gastric nutrition	69 (79.3)	44 (88)	25 (67.6)		0.0200*		0.1819
Traqueostomy	49 (56.3)	26 (52)	23 (62.2)		0.3448		--
Hemodialysis	31 (35.6)	22 (44)	9 (24.3)		0.0582		--
Surgery	47 (54)	25 (50)	22 (59.4)		0.3814		--
Prior use of antibiotic	76 (87.3)	46 (92)	30 (81.1)		0.1923		--
Inappropriate antibiotic empirical therapy	53 (61)	42 (84)	11 (29.7)		0.001*		0.0001*
Primary bacteremia	57 (65.5)	31 (62)	26 (70.3)		0.4223		--
Secondary bacteremia	30 (34.5)	19 (37)	11 (29.7)		0.4223		--
MDR ⁴	60 (69)	33 (66)	27 (73)		0.6450		--
Polymicrobial bloodstream infection	11 (12.6)	6(12)	5(13.5)		1.000		--

Note: ¹Odds ratio; ²Confidence interval; ³P value; ⁴Multidrug Resistance; *P statistically significant ($\leq 0,05$).

The mean age among patients who died was 61 years (range 9 months to 89 years) and the majority of these patients had more comorbidity than the patients who survived (76% versus 37.8%). Also, a major frequency of invasive device use was observed among patients with death results within 30 days: CVC (92%), a vesical catheter (78%) and mechanic ventilator (76%). The major of patients who died used previous antibiotic therapy (92%) and were submitted to inappropriate empirical antibiotic therapy (84%). Furthermore, inappropriate antibiotic empirical therapy was independently associated with death.

The mean length of hospitalization was 87 days for survivors and 41.6 days for non-survivors. The Kaplan–Meier cumulative survival estimates (Figure 1) for patients with inappropriate versus appropriate therapy showed that the first group had a lower probability of survival ($P=0.0001$). The 30-day mortality rate of the first group was 79.2%, while the second group was 23.5%.

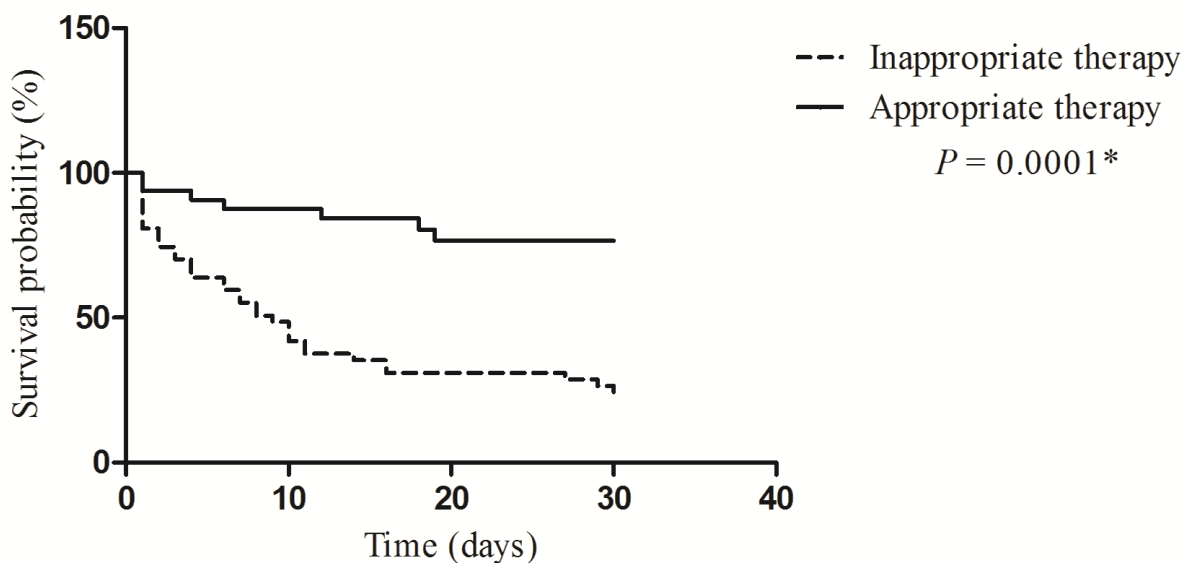


Figure 1: Survival curve (30 days) using the Kaplan–Meier method for patients who received antimicrobial appropriate therapy compared with those who received inappropriate empirical therapy

Discussion

The rapid emergence and spread of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* are a worldwide public health problem, especially in less developed countries as Brazil, where there is a lack of efficient prevention and control actions.^{1,6}

The development of BSI contributes to the severity of the clinical condition during the hospitalization of the patients who have surgery, immunocompromised, in the use of invasive devices and have greater illness severity. Currently, infection by carbapenem-resistant *P. aeruginosa*, increase the risk of inappropriate empirical antibiotic therapy, what is frequent in hospitals worldwide, but more frequent in lower and middle-income countries.^{1,7,8}

This study indicates that older patients, who remained hospitalized longer and with some comorbidity or use of invasive devices, such as cancer and are in use of enteral or gastric nutrition probes were associated with worse outcomes, as well as, those that were in use of inappropriate empirical antibiotic therapy. According to the literature, escalation rates of antibiotic resistance and inappropriate empirical therapy add substantially the morbidity, mortality, hospitalization length and cost related to bloodstream infectious MDR microorganisms.^{8,9}

In this study, patients who use inappropriate antimicrobial therapy increase the risk of the outcome of death in 14 times. In a study with leukemia patients, observed that BSI caused by MDR *P. aeruginosa* with inappropriate antibiotic therapy increased the risk to the outcome to death of these patients in 12.8 times. However, it can be avoided by implementing protocols, and greater agility in the execution of microbiological tests for microbial identification and susceptibility. These protocols must be developed for each hospital, based on data from active epidemiological surveillance, which allows knowing the predominant species in each hospital unit, as well as, the most frequently observed resistance mechanisms.⁹

In this study, inappropriate empirical therapy was an independent risk factor for 30-day mortality. Similarly, Martinez-Nadal et al. (2020)⁷, in a study carried out in two Spanish hospitals, observed that inadequate therapy was an independent factor associated with increased mortality in patients with BSI caused by *P. aeruginosa*. According to Montero and collaborators (2020) appropriate empirical therapy in patients with BSI by extensive drug resistance *P. aeruginosa* acts as a protective factor, preventing early mortality.¹⁰

This study observed that *P. aeruginosa* causing BSI in this hospital were highly resistant to most antibiotics commonly used in our setting. This trend of resistance could be accounted for by increasingly empirical use of antibiotics; in most cases, indiscriminate and intense use of antibiotics. According to literature empiric treatments often fail and increasing mortality.^{9,10}

Our study had limitations. It was a single-centered, retrospective with small sample size. However, this study generated valuable data regarding infection control aspects, and how it impacts the outcomes of hospitalized patients who had BSI by carbapenem-resistant *P.*

aeruginosa and were treated with inappropriate antibiotic therapy. Results should be validated in other centers and on larger populations.

These findings some insights about the relationship between higher mortality and inappropriate empirical therapy for patients with BSI by *P. aeruginosa*. There is a need for better diagnostic tests and infection control programs should focus on de-escalation the antibiotic inappropriate empirical therapy, mainly in BSI caused by carbapenem-resistant *P. aeruginosa*.

Acknowledgments

We thank the Clinical Hospital of Federal University of Uberlândia staff members for their cooperation.

Funding sources: This research received funding from public agencies dedicated to the promotion of scientific and technological research: Minas Gerais State Agency for Research and Development (FAPEMIG)/PPSUS (N° APQ-04062-17) and National Council for Scientific and Technological Development (CNPQ). (N° 428397/2018-2).

Conflict of interest: None.

References

1. Santos ICO, Pereira de Andrade NF, da Conceição Neto OC, et al. Epidemiology and antibiotic resistance trends in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Rio de Janeiro - Brazil: Importance of mutational mechanisms over the years (1995-2015). *Infect Genet Evol.* 2019; 73: 411-415. doi: 10.1016/j.meegid.2019.05.015.
2. Braga IA, Campos PA, Gontijo-Filho PP, Ribas RM. Multi-hospital point prevalence study of healthcare-associated infections in 28 adult intensive care units in Brazil. *J Hosp Infect.* 2018; 99: 318-324. doi: 10.1016/j.jhin.2018.03.003.
3. Bassetti M, Righi E, Carnelutti A. Bloodstream infections in the Intensive Care Unit. *Virulence.* 2016; 7: 267-279. doi:10.1080/21505594.2015.1134072.
4. Daikos GL, Tsaousi S, Tzouveleki LS, et al. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections: lowering mortality by antibiotic combination schemes and the role of carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58: 2322-8, 2014. doi: 10.1128/AAC.02166-13.
5. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012; 18: 268–281. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.
6. Balkhair A, Al-Muharrmi Z, Al'Adawi B, et al. Prevalence and 30-day all-cause mortality of carbapenem-and colistin-resistant bacteraemia caused by *Acinetobacter baumannii*,

Pseudomonas aeruginosa, and *Klebsiella pneumoniae*: Description of a decade-long trend. *Int J Infect Dis*. 2019; 85: 10-15. doi: 10.1016/j.ijid.2019.05.004.

7. Martinez-Nadal G, Puerta-Alcalde P, Gudiol C, Cardozo C, et al. Inappropriate empirical antibiotic treatment in high-risk neutropenic patients with bacteremia in the Era of Multidrug Resistance. *Clin Infect Dis*. 2020; 70: 1068–74. doi: <https://doi.org/10.1093/cid/ciz319>.

8. Kim YJ, Jun YH, Kim YR, Park KG, Park YJ, Kang JY, Kim SI. Risk factors for mortality in patients with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia; retrospective study of the impact of combination antimicrobial therapy. *BMC Infect Dis*. 2014; 14: 161. doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-161>.

9. Garcia-Vidal C, Cardozo-Espinola C, Puerta-Alcalde P, et al. Risk factors for mortality in patients with acute leukemia and bloodstream infections in the era of multiresistance. *PLoS One*. 2018; 13: e0199531. doi:10.1371/journal.pone.0199531.

10. Montero MM, López Montesinos I, Knobel H, et al. Risk Factors for Mortality among Patients with *Pseudomonas aeruginosa* Bloodstream Infections: What Is the Influence of XDR Phenotype on Outcomes? *J Clin Med*. 2020; 9: 514. doi: <https://doi.org/10.3390/jcm9020514>.

Capítulo V

Artigo 4

Inappropriate empirical antibiotic treatment in patients with infections by *Pseudomonas aeruginosa* in the era of multidrug resistance

Jane Eire Urzedo^a, Ralciane de Paula Menezes^b, Melina Lorraine Ferreira,^a Iara Rossi Gonçalves^a, Cristiane Silveira de Brito,^a Paulo P. Gontijo-Filho^a; Rosineide Marques Ribas^{a#}

Institute of Biomedical Sciences (ICBIM), Laboratory of Molecular Microbiology, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Minas Gerais, Brazil^a.

Technical School of Health (ESTES), Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Minas Gerais, Brazil^b.

#Corresponding author: Rosineide Marques Ribas

Email: rosi_ribas@yahoo.com.br

Phone: +55 (34) 3225 8574

Address: Av. Pará, 1720, Umuarama, Uberlândia MG, 38405-320, Brazil.

ABSTRACT

Background: *Pseudomonas aeruginosa* remains a significant cause of nosocomial infections and responsible for high morbidity and mortality, especially in healthcare-associated infections. We aimed to describe the current rates of inappropriate antibiotic treatment in patients with multi-drug resistant *P. aeruginosa* infection and its impact on mortality. **Material and methods:** A retrospective cohort study including 262 patients with non-duplicate *P. aeruginosa* infections was performed. The medical records of cohort diagnosed with *P. aeruginosa* infections from January 2009 to June 2019 at the Clinical Microbiology Laboratory of Hospital (Brazil), a 506-bed tertiary-care university hospital, were reviewed. Only the first infection episode for each patient was included in the analysis. **Results:** 138 patients (52.7%) had received inappropriate antimicrobial therapy. A significant difference in the 30-day mortality rate was found between the inappropriate empirical therapy group and the appropriate therapy group (63/138 [45.6%] vs. 33/124 [26.6%], $P = 0.0014$). Most of the isolates included in the study were considered multidrug resistance (59.5%) and *P. aeruginosa* extensive drug-resistant corresponded to 35.5% of the total isolates. Patients with multidrug resistance infection showed significant association with high mortality. The presence of heart failure, chronic renal failure, cancer and use of parenteral nutrition were independent risk factors for the administration of inappropriate antimicrobial therapy. **Conclusions:** This study demonstrated that inappropriate antimicrobial is frequent and our data suggest that the inappropriate antimicrobial therapy significantly affected the outcome of patients with *P. aeruginosa* infections. Change that reality, in turn is, the main factor to improve outcomes.

Keywords: carbapenem-resistant *P. aeruginosa*; inappropriate antimicrobial therapy;

Pseudomonas aeruginosa; healthcare-associated infection

INTRODUCTION

Healthcare-associated infections (HAI) are a public health problem and *Pseudomonas aeruginosa* is one of the main agents causing HAI in the world, especially in lower and middle-income countries, like Brazil [1-4].

Carbapenems are the antimicrobials of the first choice for the treatment by Gram-negative HAI bacteria, but their use has been threatened by the increase in resistant clinical isolates, especially *P. aeruginosa*, responsible for nosocomial outbreaks in hospitals in several countries [5,6]. *P. aeruginosa* is a very versatile microorganism capable of developing resistance to antimicrobials of the various classes used in the treatment of HAI, resulting in a significant increase in resistant multidrug isolates in a hospital environment. This phenotype limits the therapeutic options used in the treatment of invasive infections and increases the chances of the patient receiving inappropriate empirical therapy, resulting in increased morbidity and mortality rates [7-9].

Despite the severity of this situation, few studies evaluate the impact of inappropriate empirical therapy on the evolution of patients with invasive infections caused by resistant *P. aeruginosa* in hospitals in underdeveloped countries. Therefore, this study aims to evaluate the risk factors for inappropriate empirical therapy and the impact this therapy in the mortality of patients with invasive carbapenem-resistant *P. aeruginosa* infections in a highly complex hospital in Brazil.

MATERIAL AND METHODS

Study design, Patients and setting

This is an observational retrospective cohort study, was carried out at the Clinical Hospital of Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU), a highly complex hospital, which has 506 beds and is a reference for the region.

A cohort of patients admitted to the hospital who had infection by *P. aeruginosa* carbapenem-resistant between January 2009 to June 2019 was selected to study. To determine the risk factors for mortality and the impact of inappropriate empirical therapy on the evolution of each patient the hospital records were analyzed and obtain demographic and clinical data, including intrinsic and extrinsic risk factors. The clinical microbiology laboratory database was

reviewed and only the first episode of infection was analyzed for these patients with more than one episode.

Antimicrobial therapy was considered inappropriate when the patient was given antimicrobials that did not present "in vitro" activity and/or when treatment was started over 48 hours after infection [10,11].

Multidrug resistance (MDR) was defined as acquired non-susceptibility to at least one agent belonging to three or more. Extensively Resistant (XDR) categories as those presenting resistance to at least one antimicrobial of all classes [12].

Bacterial isolates and clinical microbiology

A total of 262 consecutive non-duplicate *P. aeruginosa* isolates were included in the study. Cultures were collected according to the protocol used by the Microbiology Laboratory of the HC-UFU, and the identification and antimicrobial susceptibility tests were performed by automation using the Vitek® Biomérieux system. The antimicrobials tested were: piperacillin/tazobactam, gentamicin, amikacin, cefepima, ciprofloxacin, colistin, imipenem and meropenem and the strains that showed intermediate susceptibility were considered resistant.

Statistical analysis

Student's t-test was used to compare continuous variables, and X^2 or Fisher's exact tests were used to compare categorical variables. To determine independent risk factors for mortality among patients who received inappropriate or inappropriate empirical therapy, a multiple logistic regression model was used to control for the effects of confounding variables. All $P \leq 0.05$ were considered statistically significant.

Ethical approval

The Committee of Ethics in Research approved the research with Human Participants at the Federal University of Uberlandia (Approval No. 2.527.621).

RESULTS

Of the 262 patients included in the study, 69.5% were male, with a mean age of 54.5 years. Most of the patients required admission to the Intensive Care Unit (ICU), where they stayed on average 20 days, and 52.7% were submitted to inappropriate antimicrobial therapy. The total mortality rate was 50%, and 96 (36.6%) patients died within 30 days after the first infection episode. Of the total number of patients who died, 123 (93.9%) used antimicrobial

therapy before the diagnosis of infection, cephalosporins being the most commonly used class (77.9%) and 83 (63.5%) received inappropriate antimicrobial therapy (Table 1). Most of the isolates included in the study were considered MDR (59.5%) and *P. aeruginosa* XDR corresponded to 35.5% of the total isolates.

It was observed that the presence of heart failure, chronic renal failure, cancer and use of parenteral nutrition were independent risk factors for the administration of inappropriate antimicrobial therapy. Also, death in 30 days was significantly higher among patients who received inappropriate empirical therapy ($P=0.0014$) (Table 1).

Table 1: Risk factors for Antibiotic empirical therapy inappropriate and evolution of patients with the *Pseudomonas aeruginosa* resistant to carbapenemics

Characteristics	Total N= 262 (%)	Antibiotic empirical therapy		Statistical analysis			
		Inappropriate	Appropriate	Univariate		Multivariate	
		N= 138 (%)	N= 124 (%)	OR ¹ (IC ² 95%)	P ³	OR ¹ (IC ² 95%)	P ³
Male Sex	182 (69.5)	91 (65.9)	91 (73.4)	0.70 (0.41-1.19)	0.1914	-	-
Mean age in years (SD⁴)	54.58±21.9	56.48±21.4	52.47±22.5	-	0.1502	-	-
Length of hospital stay-mean (days)	61.22±49.1	55.01±44.73	68.12±53	-	0.0234*	-	-
Intensive Care Unit	182 (69.5)	94 (68.1)	88 (71)	0.87 (0.51-1.48)	0.6168	-	-
Length of ICU⁵ stay-mean (days)	20.09±19.8	27.84±20.53	30.43±19.16	-	0.1315	-	-
Average hospitalization time after diagnosis (± SD) days	31.31±48.8	27.5±49.9	35.5±47.3	-	0.0011*	-	-
Comorbidity/ Underlying disease							
Heart Failure	52 (19.8)	38 (27.5)	14 (11.3)	2.98 (1.52 – 5.83)	0.0010*	0.46 (0.22 - 0.96)	0.040*
Cancer	35 (13.3)	25 (18.1)	10 (8.1)	2.52 (1.16-5.49)	0.0170*	0.40 (0.17 -0.92)	0.033*
Diabetes Mellitus	50 (19.1)	26 (18.8)	24 (19.3)	0.96 (0.52-1.79)	0.9158	-	-
Chronic Renal Failure	33 (12.6)	29 (21)	4 (3.2)	7.98 (2.71-23.44)	0.0001*	0.18 (0.05 - 0.58)	0.004*
Lung disease	9 (3.4)	2 (1.4)	7 (5.6)	0.24 (0.05-1.20)	0.0892	-	-
Invasive Procedures							
Mechanical ventilation	191 (72.9)	101 (73.2)	90 (72.6)	1.03 (0.59 -1.78)	0.9120	-	-
Tracheostomy	134(51.1)	64 (46.4)	70 (56.4)	0.66 (0.40 -1.08)	0.1033	-	-
Urinary cateter	181 (69.1)	95 (68.8)	86 (69.3)	0.97 (0.57-1.65)	0.9283	-	-
Central Venous Catheter	213 (81.3)	112 (81.1)	101 (81.4)	0.98 (0.52-1.82)	0.9517	-	-
Surgical drain	54 (20.6)	29 (21)	25 (20.2)	1.05 (0.57 -1.92)	0.8646	-	-

Enteral or gastric nutrition probes	178 (67.9)	94 (68.1)	84 (67.7)	1.01 (0.60-1.71)	0.9484	-	-
Hemodialysis	57 (21.7)	43 (31.1)	14 (11.3)	3.55 (1.83- 6.90)	0.0001*	0.54 (0.25 - 1.17)	0.120
Parenteral Nutrition	25 (9.5)	20 (14.5)	5 (4.0)	4.03 (1.46 -11.11)	0.0053*	0.33 (0.11 - 0.99)	0.049*
Prior use of antibiotic	236 (90.1)	126 (91.3)	110 (88.7)	1.33 (0.59 -3.01)	0.4831	-	-
Aminoglycosides	16 (6.1)	6 (4.3)	10 (8.0)	0.51 (0.18 -1.47)	0.2097	-	-
Carbapenems	157 (60)	82 (59.4)	75 (60.5)	0.95 (0.58 -1.57)	0.8608	-	-
Cephalosporins 3th, 4th	190 (72.5)	103 (74.6)	87 (70.2)	1.25 (0.72-2.15)	0.4177	-	-
Polymyxin	63 (24)	30 (21.7)	33 (26.6)	0.76 (0.43 -1.35)	0.3567	-	-
Fluoroquinolones	44 (16.8)	26 (18.8)	18 (14.5)	1.36 (0.70-2.63)	0.3498	-	-
Primary bacteremia	57 (21.7)	34 (24.6)	23 (18.5)	1.43 (0.79-2.60)	0.2330	-	-
Secondary bacteremia	30 (11.5)	19 (13.8)	11 (8.9)	1.64 (0.74 -3.60)	0.2139	-	-
Pneumonia	99 (37.8)	49 (35.5)	50 (40.3)	0.81 (0.49-1.34)	0.422	-	-
Urinary Tract Infection	30 (11.4)	16 (11.6)	14 (11.3)	1.03 (0.48-2.21)	0.005*	0.66 (0.27 – 1.59)	0.360
Other sites⁶	46 (17.5)	20 (14.5)	26 (20.9)	0.63 (0.33-1.21)	1.892	-	-
MDR⁷	156 (59.5)	84 (60.9)	72 (58)	1.12 (0.68-1.84)	0.6442	-	-
Polymicrobial infection	58 (22.1)	32 (23.2)	26 (20.9)	1.13 (0.63-2.05)	0.6655	-	-
Death	131 (50)	83 (60.1)	48 (38.7)	2.38 (1.45 -3.92)	0.0005*	0.98 (0.41 - 2.34)	0.973
Death – 30 days	96 (36.6)	63 (45.6)	33 (26.6)	2.31 (1.37 -3.89)	0.0014*	0.60 (0.24 -1.46)	0.260

Note: ¹Odds ratio; ²Confidence interval; ³P value; ⁴Standard deviation; ⁵Intensive Care Unit; ⁶Ascitic fluid, cavity abscess, wound secretion, ocular secretion, liquor; ⁷Multidrug-resistant, *Statistically significant P (≤ 0.05).

Patients who underwent appropriate therapy had a significantly longer hospital stay when compared to patients using inappropriate therapy (68.1 and 55 days, respectively).

The mean length of hospitalization for those patients with *P. aeruginosa* MDR infection (59.7 days) was shorter than the length of hospitalization for patients with non-MDR *P. aeruginosa* infection (64.2 days).

The Kaplan – Meier cumulative survival estimates for patients with inappropriate versus appropriate therapy showed that the first group had a lower probability of survival ($P = 0.0013$) (Figure 1A). The rate of 30-day mortality was 45.6% and 26.6%, respectively.

When considering only patients with MDR *P. aeruginosa* infection, it was observed that the 30-day mortality was significantly higher among patients undergoing inappropriate antimicrobial therapy ($P = 0.0005$), since 45.2% of these patients died. In contrast, the mortality rate among patients with MDR *P. aeruginosa* infection and who received appropriate antibiotic therapy was 20.8% (Figure 1B).

In the group of patients with infection by non-MDR *P. aeruginosa*, the death in 30 days did not present a significant difference between the group treated appropriately and the group submitted to inappropriate therapy (Figure 1C).

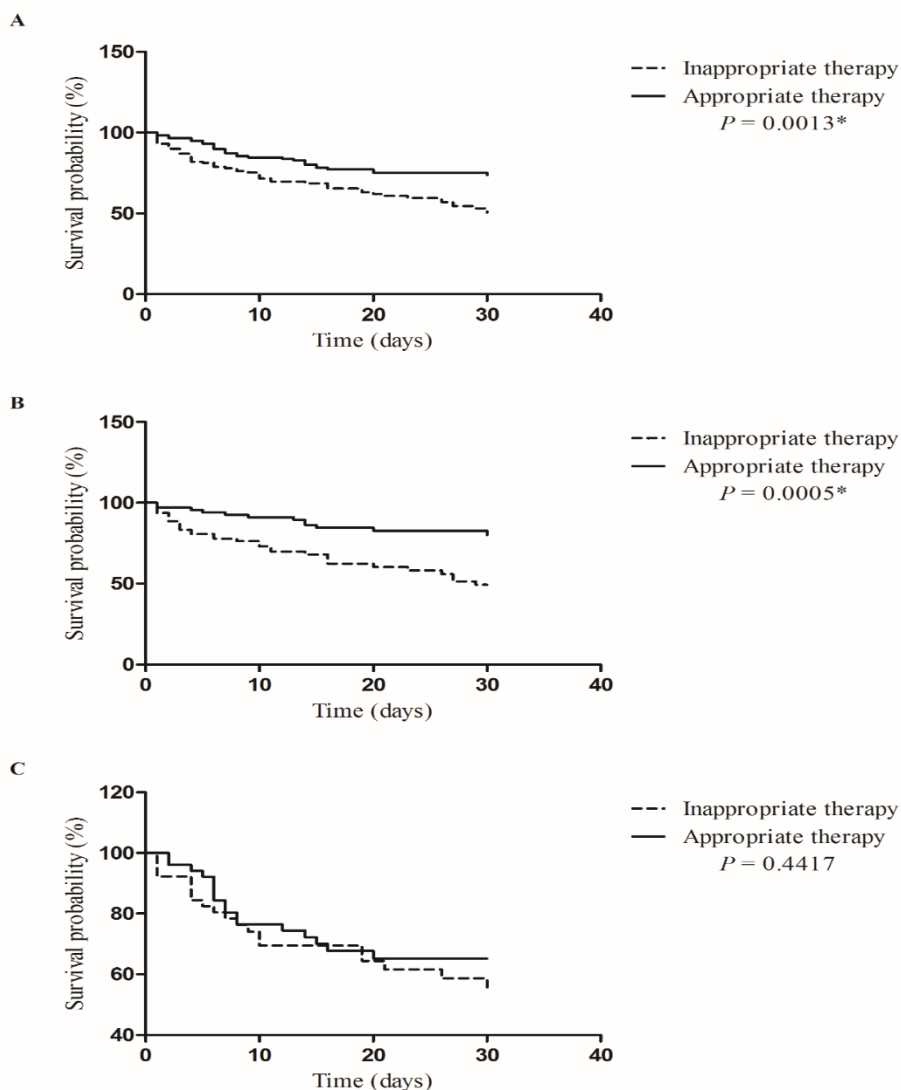


Figure 1: Survival curve for: **A** - patients with infection by *P. aeruginosa* who received antimicrobial appropriate therapy compared with those who received inappropriate empirical therapy. **B** - patients with MDR *P. aeruginosa* infection who received antimicrobial appropriate therapy compared with those who received inappropriate empirical therapy. **C** - patients with non-MDR *P. aeruginosa* infection who received antimicrobial appropriate therapy compared with those who received inappropriate empirical therapy

DISCUSSION

The current study describes the epidemiology of a cohort of patients with risk presenting with infection by carbapenem-resistant *P. aeruginosa* and focuses on the use of inappropriate empirical therapy in this population and its impact on mortality. The most important findings were as follows: (1) rates of mortality in patients with infection were high; (2) inappropriate empirical therapy was frequent and high; (3) infection due to MDR *P. aeruginosa* was

common, and was frequently associated with inappropriate empirical therapy; (4) overall, inappropriate empirical therapy was associated to increased mortality in *P. aeruginosa* infections (5) independent risk factors for inappropriate empirical therapy in *P. aeruginosa* infections were the presence of heart failure, chronic renal failure, cancer and use of parenteral nutrition.

The frequency of MDR *P. aeruginosa* isolated on different cultures from hospital patients has steadily increased throughout the preceding years with most studies reporting a progressive increase mainly in critical patients [13-15]. These findings might be attributed, among others, to the overuse and misuse of antimicrobial compounds [14,15]. In our study draws attention that, inappropriate empirical therapy was frequent, particularly in patients with MDR *P. aeruginosa* infections.

In this study, patients who received inappropriate empirical therapy were 2.3 times more likely to evolve to death. Also, it was found that the mortality rate varied proportionally from inappropriate empirical therapy during the period of investigation. A similar association was found by Martinez Nadal et al. (2020), whose research found that only among patients with *P. aeruginosa* infection the mortality rate was significantly higher when they received inappropriate empirical therapy [13]. Although this association is not yet fully known, there is a consensus that inappropriate empirical therapy allied with *P. aeruginosa* is associated with a worse prognosis.

Multi-drug resistance in *P. aeruginosa* and inappropriate antimicrobial therapy has well-known frightening future prospects, mainly in a country the antibiotic therapy is commonly overused and often little judicious [1,7,16]. Previous studies have linked multidrug resistance in *P. aeruginosa* with worse prognosis associated with inappropriate antimicrobial therapies [4,13,15,17].

Unfortunately, we also found a high prevalence of MDR *P. aeruginosa*. This observation is concordant with other current studies, that show high and increasing prevalence, mainly in countries like Brazil [1,16,18,19]. As a consequence, makes *P. aeruginosa* coverage a major problem [20]. In these countries, this problem is made even more serious by limited financial resources, which reduce access to broad-spectrum antimicrobials due to high cost, shortage of trained personnel and supplies, lack of compliance to hand hygiene and lack of access to microbiology laboratories [21,22].

Although this study was conducted in a single tertiary hospital in Brazil and with a relatively small sample group, the results found to indicate an increasing trend of *P. aeruginosa* MDR and XDR infection cases, reflecting a higher inappropriate prescription of antimicrobials and, consequently, an increased mortality rate. Results should be validated in other centers and on larger populations.

The results presented in this study allow us to conclude that the frequency of MDR *P. aeruginosa* in the hospital under study is high. Also, more severe patients who develop infections by *P. aeruginosa* are more likely to undergo inappropriate antimicrobial therapy. Finally, the inadequate prescription of antimicrobials significantly reduces the survival of patients with infections by *P. aeruginosa*. Thus, in addition to active surveillance, the rational use of existing antimicrobials, especially those of broad-spectrum, should be encouraged for the effective control and possible reduction of MDR microorganisms, as well as for the successful treatment of infections caused by them and consequent reduction in mortality.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Clinical Hospital of Federal University of Uberlandia staff members for their cooperation.

Funding sources

This research received funding from public agencies dedicated to the promotion of scientific and technological research, as follows: Minas Gerais State Agency for Research and Development (FAPEMIG)/PPSUS (Nº APQ-04062-17) and National Council for Scientific and Technological Development (CNPQ). (Nº 428397/2018-2).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Referências

- [1] de Oliveira Santos IC, Pereira de Andrade NF, da Conceição Neto OC, da Costa BS, de Andrade Marques E, Rocha-de-Souza CM, et al. Epidemiology and antibiotic resistance trends in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Rio de Janeiro - Brazil: Importance of mutational mechanisms over the years (1995-2015). *Infect Genet Evol.* 2019;73:411-415. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.05.015>
- [2] Braga IA, Campos PA, Gontijo-Filho PP, Ribas RM. Multi-hospital point prevalence study of healthcare-associated infections in 28 adult intensive care units in Brazil. *J Hosp Infect.* 2018;99:318-324. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2018.03.003>

- [3] Atay G, Kara M, Sütçü M, Aydın YŞ, Torun SH, Karapınar BA, et al. Resistant gram-negative infections in a pediatric intensive care unit: a retrospective study in a tertiary care center. *Turk Pediatri Ars.* 2019;54:105-112. <https://doi.org/10.14744/TurkPediatriArs.2019.00086>
- [4] Sader HS, Castanheira M, Farrell DJ, Flamm RK, Mendes RE, Jones RN. Tigecycline antimicrobial activity tested against clinical bacteria from Latin American medical centres: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2011-2014). *Int J Antimicrob Agents.* 2016;48:144-50. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.04.021>
- [5] Chou CH, Lai YR, Chi CY, Ho MW, Chen CL, Liao WC, et al. Long-Term Surveillance of Antibiotic Prescriptions and the Prevalence of Antimicrobial Resistance in Non-Fermenting Gram-Negative Bacilli. *Microorganisms.* 2020;8:397. doi: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030397>
- [6] Quiles MG, Carlesse F, da Silva MA, Mingrone RC, Fonseca JM, Silva DC, et al. High mortality outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection in a Brazilian pediatric oncology hospital. *Braz J Infect Dis.* 2017;21:205-206. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2016.10.012>
- [7] Botelho J, Grosso F, Peixe L. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* - Mechanisms, epidemiology and evolution. *Drug Resist Updat.* 2019;44:100640. doi: <https://doi.org/10.1016/j.drug.2019.07.002>
- [8] Bassetti M, Vena A, Croxatto A, Righi E, Guery B. How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs Context.* 2018;7:212527. <https://doi.org/10.7573/dic.212527>
- [9] Ruiz-Garbajosa P, Cantón R. Epidemiology of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Implications for empiric and definitive therapy. *Rev Esp Quimioter.* 2017;30:1:8-12.
- [10] Daikos GL, Tsaousi S, Tzouveleki LS, Anyfantis I, Psychogiou M, Argyropoulou A, et al. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections: lowering mortality by antibiotic combination schemes and the role of carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58:2322-8. <https://doi.org/10.1128/AAC.02166-13>
- [11] Gilbert DN, Sande MA, Moellering RC, Eliopoulos GM. *The Sanford guide to antimicrobial therapy* 2007. Sperryville, VA: Antimicrobial Therapy Incorporated, 37th ed., 2007.
- [12] Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012 Mar;18:268-81. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- [13] Martinez-Nadal G, Puerta-Alcalde P, Gudiol C, Cardozo C, Albasanz-Puig A, Marco F, et al. Inappropriate Empirical Antibiotic Treatment in High-risk Neutropenic Patients With Bacteremia in the Era of Multidrug Resistance. *Clin Infect Dis.* 2020;70:1068-1074. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz319>
- [14] Garcia-Vidal C, Cardozo-Espinola C, Puerta-Alcalde P, Marco F, Tellez A, Agüero D, et al. Risk factors for mortality in patients with acute leukemia and bloodstream infections in the era of multiresistance. *PLoS One.* 2018;13:e0199531. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199531>

- [15] Coulter S, Roberts JA, Hajkovicz K, Halton K. The Use of Bloodstream Infection Mortality to Measure the Impact of Antimicrobial Stewardship Interventions: Assessing the Evidence. *Infect Dis Rep*. 2017;9:6849. <https://doi.org/10.4081/idr.2017.6849>
- [16] Rossi Gonçalves I, Dantas RCC, Ferreira ML, Batistão DWDF, Gontijo-Filho PP, Ribas RM. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: association with virulence genes and biofilm formation. *Braz J Microbiol*. 2017;48:211-217. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.11.004>
- [17] Sader HS, Huband MD, Castanheira M, Flamm RK. *Pseudomonas aeruginosa* Antimicrobial Susceptibility Results from Four Years (2012 to 2015) of the International Network for Optimal Resistance Monitoring Program in the United States. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61:e02252-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02252-16>
- [18] Zhang Y, Zhong ZF, Chen SX, Zhou DR, Li ZK, Meng Y, et al. Prevalence of healthcare-associated infections and antimicrobial use in China: Results from the 2018 point prevalence survey in 189 hospitals in Guangdong Province. *Int J Infect Dis*. 2019;89:179-184. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.09.021>
- [19] Matos EC, Matos HJ, Conceição ML, Rodrigues YC, Carneiro IC, Lima KV. Clinical and microbiological features of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* in patients hospitalized in intensive care units. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2016;49:305-11 <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0446-2015>
- [20] Ponce de Leon A, Merchant S, Raman G, Avendano E, Chan J, Tepichin Hernandez G, Sarpong E. *Pseudomonas* infections among hospitalized adults in Latin America: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis*. 2020;20:250. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-04973-0>
- [21] Alp E, Damani N. Healthcare-associated infections in intensive care units: epidemiology and infection control in low-to-middle income countries. *J Infect Dev Ctries*. 2015;9:1040-5. <https://doi.org/10.3855/jidc.6832>
- [22] Fortaleza CMCB, Padoveze MC, Kiffer CRV, Barth AL, Carneiro ICDRS, Giamberardino HIG, et al. Multi-state survey of healthcare-associated infections in acute care hospitals in Brazil. *J Hosp Infect*. 2017;96:139-144. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2017.03.024>

Capítulo VI

Artigo 5

Weighting the impact of genotype type III secretion system virulence on the outcome of Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections

Jane Eire Urzedo^a, Ralciane de Paula Menezes^b, Melina Lorraine Ferreira^a, Cristiane Silveira de Brito^a, Paulo P. Gontijo-Filho^a, Rosineide Marques Ribas^{a#}

Institute of Biomedical Sciences (ICBIM), Laboratory of Molecular Microbiology, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Minas Gerais, Brazil^a.

Technical School of Health (ESTES), Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Minas Gerais, Brazil^b.

#Corresponding author: Rosineide Marques Ribas

Email: rosi_ribas@yahoo.com.br

Phone: +55 (34) 3225 8574

Address: Av. Pará, 1720, Umuarama, Uberlândia MG, 38405-320, Brazil.

ABSTRACT

Background: From a clinical point of view, detection of Type III Secretion System (T3SS) genes in hospital isolates of multidrug-resistant *P. aeruginosa* could be useful, because these genes may be associated with a poor prognosis in patients with infection. **Aims:** We investigated the impact of the virulence genotype T3SS on mortality in carbapenem-resistant *P. aeruginosa* infections. **Methods:** A total of 76 *P. aeruginosa* infections isolates recovered from a hospital were analyzed. Clinical variables, susceptibility profiles and T3SS genotypes (*exoS*, *exoY*, *exoT* and *exoU*) and presence of the MBL genes (*bla_{IPM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{GIM}*, *bla_{NDM}* and *bla_{SPM}*) were available from PCR. The main outcomes analysed was 5-day and 30-day mortality. **Results:** Up to 77.6% (59/76) of the isolates showed a high-virulence phenotype, and 22.4% (17/76) a low-virulence one. Interestingly, 4 isolates possessing both *exoU* and *exoS* genes were detected simultaneously. No association between virulence phenotype and the main outcome variable (30-day mortality) was found. However, significant mortality 5-day (about 20%) was observed among patients who had more virulent strains. The presence of comorbidities, such as chronic kidney disease, male gender and Intensive Care Unit admission were risk factors for infection with more virulent genotypes. The presence of *exoU* and *exoS* in *P. aeruginosa* isolates was significantly differently distributed between the multi-drug resistant and non-multi-drug resistant isolates (40.7% vs 15.2%, respectively). The *exoU* genotype was significantly more frequent among multiresistant strains. Inappropriate empirical therapy was significantly impacted by *P. aeruginosa* *exoS*+. **Conclusions:** Inappropriate empirical therapy is a crucial factor in the worst prognosis among patients with infection caused by multiresistant *P. aeruginosa*, regardless of the genotype associated with the virulence of T3SS.

Keywords: Type III secretion system; multidrug resistance; virulence; Carbapenemase, *Pseudomonas aeruginosa*, inappropriate empirical therapy, mortality.

Introduction

The emergence of multi-drug resistance *P. aeruginosa* is a global problem [1,2] resulting in a negative impact on effective antimicrobial therapy. The increased mortality in resistant *P. aeruginosa* infections has been associated with inappropriate empirical therapy [3-5] and in Brazil, the antibiotic therapy is commonly overused and often little judicious [6,7].

Multiple factors contribute to the worse clinical outcomes of *P. aeruginosa* infections, but we can highlight the resistance antimicrobial and virulence factors, mainly the Type III Secretion System (T3SS), which directly injects effector toxins (ExoT, ExoY, ExoS and ExoU) into the host cells [8-10]. Understanding the interplay between these factors is of paramount relevance for the analysis of the outcomes of resistant *P. aeruginosa* infections inpatients.

Infections caused by resistant *P. aeruginosa*, inappropriate empirical therapy and virulence were significantly interconnected in a previous study [8,9,11] having a major impact on the mortality of hospitalized patients. Therefore, in this manuscript, we investigate the impact of the virulence phenotype T3SS on mortality in carbapenem-resistant *P. aeruginosa* infections.

METHODS

Patients and setting:

The study was conducted at the Uberlandia University Hospital (Brazil), a referral tertiary care facility affiliated with the Uberlandia Federal University following approval by the research Ethics Committee. A retrospective cohort study was established based on *P. aeruginosa* infections isolates collected according to the protocol used by the Microbiology Laboratory of the hospital, that was stored in a databank from the University. Patients were included only once in the database to ensure the independence of observation. Among those with multiple infections episodes, only the first event was analyzed. The cohort database included information on sociodemographic characteristics (age, gender), presence of Intensive Care Unit (ICU), comorbidities, phenotypes, early mortality (5 days) and mortality 30 days and inappropriate empirical therapy. A total of 76 *P. aeruginosa* infections isolates recovered from a hospital were analyzed.

Definitions

Antimicrobial therapy was considered inappropriate when the patient was given antimicrobials that did not show "in vitro" activity and/or when treatment was started over 48 hours after infection [12,13].

Resistance phenotype stratification of isolates was made following Magiorakos et al. (2012) [14]. A multidrug resistance (MDR) isolate was defined as a strain non-susceptible to at least one agent in three or more antipseudomonal antimicrobial categories. An XDR isolate was defined as non-susceptible to at least one agent in all but up to two antipseudomonal antimicrobial categories; hence, an extensive drug resistance (XDR) isolate was also included in the MDR category.

The primary endpoint of this study was 5 and 30-day in hospital all-cause mortality.

Information on the T3SS genotype (presence of *exoU*, *exoS*, *exoY* and *exoT* genes) was also available from previous studies [15].

Bacterial isolates and Molecular testing

The identification and antimicrobial susceptibility tests were performed by automation using the Vitek® Biomérieux system and the strains that showed intermediate susceptibility were considered resistant. All Polymerase Chain Reaction (PCR) primers and reaction conditions used in this study are described by Urzedo et al. [15]. To assess the presence of the MBL genes (*bla_{IPM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{GIM}*, *bla_{NDM}* and *bla_{SPM}*) in *P. aeruginosa* strains, a multiplex PCR was performed, as described previously [11]. The presence of the T3SS virulence genes (*exoS*, *exoY*, *exoT* and *exoU*) was determined by simplex PCR, as described previously [16]. All PCRs were carried out in a Mastercycler Personal (Eppendorf). *P. aeruginosa* strains PAO1 and PA103 were used as controls.

Statistical analysis

The student's t-test was used to compare continuous variables and x2 or Fisher's exact test was used to compare categorical variables. A survival curve was constructed using the Kaplan-Meier method, and the logrank test was used for comparisons between groups of patients with infections caused by different strains (*exoS*-/*exoU*-; *exoU*+/*exoS*+/-; *exoS*+; *exoU*+ or *exoS*+) and for comparisons in inappropriate and appropriate therapy between the groups. *P* values <0.05 was considered statistically significant.

Ethical approval

The research was approved by the Federal University of Uberlandia Committee of Ethics in Research with Human Participants (Approval No. 2.527.621).

RESULTS

Of the 76 *P. aeruginosa* isolates, 88.2% (67/76) possessed at least one of the four T3SS-related genes evaluated in this study (Table 1). Fifty-nine *P. aeruginosa* isolates (77.6%) harboured *exoU* and/or *exoS* genes, including the non-cytotoxic/invasive strain (*exoU*-/*exoS*+, 74.5%), cytotoxic/non-invasive strain (*exoU*+/*exoS*-, 10.2%) and the cytotoxic/invasive strain (*exoU*+/*exoS*+, 15.3%). The genes *exoY* and *exoT* were detected in 42 and 48 isolates (71.2 and 81.3%) of invasive strains, respectively.

Table 1: Distribution of the type III secretion system-related genotypes among *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from the Healthcare-associated infections

Genotype Characteristics	<i>exoU</i>	<i>exoS</i>	<i>exoY</i>	<i>exoT</i>	Nº of isolates	Percentage (%)
Non-cytotoxic/Invasive strain (<i>exoU</i> -/ <i>exoS</i> +))	-	+	+	+	31	40.8
	-	+	-	-	1	1.3
	-	+	-	+	8	10.5
	-	+	+	-	4	5.3
Cytotoxic/Non-invasive strain (<i>exoU</i> +/ <i>exoS</i> -))	+	-	+	+	6	7.9
	+	-	-	-	0	0
	+	-	+	-	0	0
	+	-	-	+	0	0
Cytotoxic/Invasive strain (<i>exoU</i> +/ <i>exoS</i> +))	+	+	+	+	7	9.2
	+	+	-	-	0	0
	+	+	+	-	0	0
	+	+	-	+	2	2.6
Non-cytotoxic/Non-invasive strain (<i>exoU</i> -/ <i>exoS</i> -))	-	-	-	-	4	5.3
	-	-	+	+	7	9.2

	-	-	+	-	0	0
	-	-	-	+	6	7.9
Total					76	100

The associations between clinical features of patients with *P. aeruginosa* infections and virulence genes to T3SS are summarized in Table 2. When comparing the groups of patients who presented infection with *P. aeruginosa* with an *exoS/exoU* negative profile with the others, we observed that individuals with the presence of comorbidity, such as chronic kidney disease, were significantly higher among the group of patients with infection by isolates with a profile *exo U+/exoS +/-* ($P = 0.0060$ and $P = 0.0380$, respectively).

When we compare the group of patients with *P. aeruginosa* *exoS/exoU* negative with those with infection by *P. aeruginosa* *exo S+* and *exoU+* or *exoS+*, we find that in addition to the presence of comorbidity ($P = 0.0225$ and $P = 0.0102$, respectively), as chronic kidney disease ($P = 0.0255$ and $P = 0.0174$, respectively), male ($P = 0.0054$ and $P = 0.0056$, respectively), non-MDR susceptibility profile ($P = 0.0054$ and $P = 0.0056$, respectively), extensively drug-resistant and the occurrence of bacteremia were also significantly higher in the positive groups for the T3SS III profile.

Ultimately, when comparing the groups of patients with *P. aeruginosa* infection with a more virulent genotype (*exo U+/ exoS +/-* vs. *exo S+*), we observed patients admitted to the ICU were more likely to develop infection with samples with an *exo S+* profile ($P = 0.0486$) (Table 2).

Table 2: Characteristics of patients with *Pseudomonas aeruginosa* infections according to T3SS III virulence genotype

Characteristics	T3SS III genotype			
	<i>exoS</i> ⁻ / <i>exoU</i> ⁻ N= 17 (%)	<i>exo U</i> ⁺ / <i>exoS</i> ^{+/-} N= 15 (%)	<i>exo S</i> ⁺ N= 44(%)	<i>exoU</i> ⁺ or <i>exoS</i> ⁺ N= 59 (%)
Male sex	9 (52.9) ^{b,c}	12 (80)	38 (86.4) ^b	50 (84.7) ^c
Age (mean ± SD)	58.1±22.2	60.5±18.5	55.8±21.1	57±20.4
Total Mortality	10 (58.2)	7 (46.7)	26 (59.1)	33 (55.9)
Late Mortality, 30 days	8 (47.1)	6 (40)	19 (22.7)	25 (42.3)
Early mortality, 5 days	0	3 (20)	9 (20.5)	12 (20.3)
<i>P. aeruginosa</i> phenotype				
Susceptible (non-MDR ¹)	8 (47.1) ^{b,c}	3 (20)	6 (13.6) ^b	9 (15.2) ^c
Multidrug-resistant	7 (41.2)	6 (40)	18 (40.9)	24 (40.7)
Extensively drug-resistant	2 (11.7) ^{b,c}	6 (40)	20 (45.5) ^b	26 (44.1) ^c
ICU ² stay	14 (82.3)	8 (53.3) ^d	35 (79.5) ^d	43 (72.9)
Length of ICU stay-mean (days)	34.7±17.1	31.1±10.3	29.4±21	29.7±19.4
Bacteremia	1 (5.9) ^{b,c}	4 (26.7)	18 (40.9) ^b	22 (37.3) ^c
Pneumonia	10 (58.2)	6 (40)	21 (47.7)	27 (45.8)
Urinary tract infection	4 (23.5)	4 (26.7)	4 (9.1)	8 (13.6)
Others sites ³	2 (11.7)	1 (6.7)	1 (2.3)	2 (3.4)
Comorbidity conditions	5 (29.4) ^{a,b,c}	12 (80) ^a	28 (63.6) ^b	40 (67.8) ^c
Heart Failure	1 (5.9)	5 (33.3)	8 (18.2)	13 (22)
Cancer	3 (17.6)	3 (20)	4 (9.1)	7 (11.9)
Diabetes Mellitus	2 (11.7)	3 (20)	13 (29.5)	16 (27.1)
Chronic Renal Failure	0 ^{a,b,c}	4 (26.7) ^a	11 (25) ^b	15 (25.4) ^c
Lung disease	0	1 (6.7)	1 (2.3)	2 (3.4)
Inappropriate empirical therapy	10 (58.2)	10 (66.6)	25 (56.8)	35 (59.3)

Note: ¹Multidrug Resistance; ²Intensive Care Unit; ³Ascitic fluid, cavity abscess, wound secretion, ocular secretion, ^{a,b,c,d} $P < 0.05$ between the groups.

Of the 76 isolates, 11 (14.5%) had MBL resistance genes, of which 10 were *bla*_{SPM} and only one *bla*_{IPM}. Among these 11 isolates, all were positive for *exoS* and only one for *exoU*.

While genes encoding *exoT* and *exoY* were found in 90.9% and 72.7% of the isolates, respectively (data not shown).

PCR analysis showed that more than 77% of the *P. aeruginosa* strains represented the T3SS genotypes *exoU*⁺ or *exoS*⁺. In the multi-drug resistant, *P. aeruginosa* isolates, the percentage of *exoU* was 20.3% (12/59), and *exoS* was 79.7% (47/59). The presence of *exoU* and *exoS* in *P. aeruginosa* isolates was significantly differently distributed between the Multi-drug resistant and non-multi-drug resistant isolates (40.7% vs 15.2%).

The overall 30-day crude mortality was 43.4%. Surprisingly, the 30-day and in-hospital mortality rates among patients with *P. aeruginosa* isolates that expressed only ExoS and ExoU protein were 22,7% and 40%, respectively, compared with 47.1% among patients whose *P. aeruginosa* did express any of the exotoxins ExoU (Table 1).

Although the survival curve does not show significant differences in the first 5 and 30-day cumulative probability of death after infections between T3SS genotype, the presence of ExoS and ExoU there was a trend toward higher mortality in these groups (Figure 1).

Further, inadequate antimicrobial therapy was associated with the worse 30-day outcomes than those who had appropriate therapy irrespective of the T3SS phenotype (55.6% versus 4% versus 25.8, respectively).

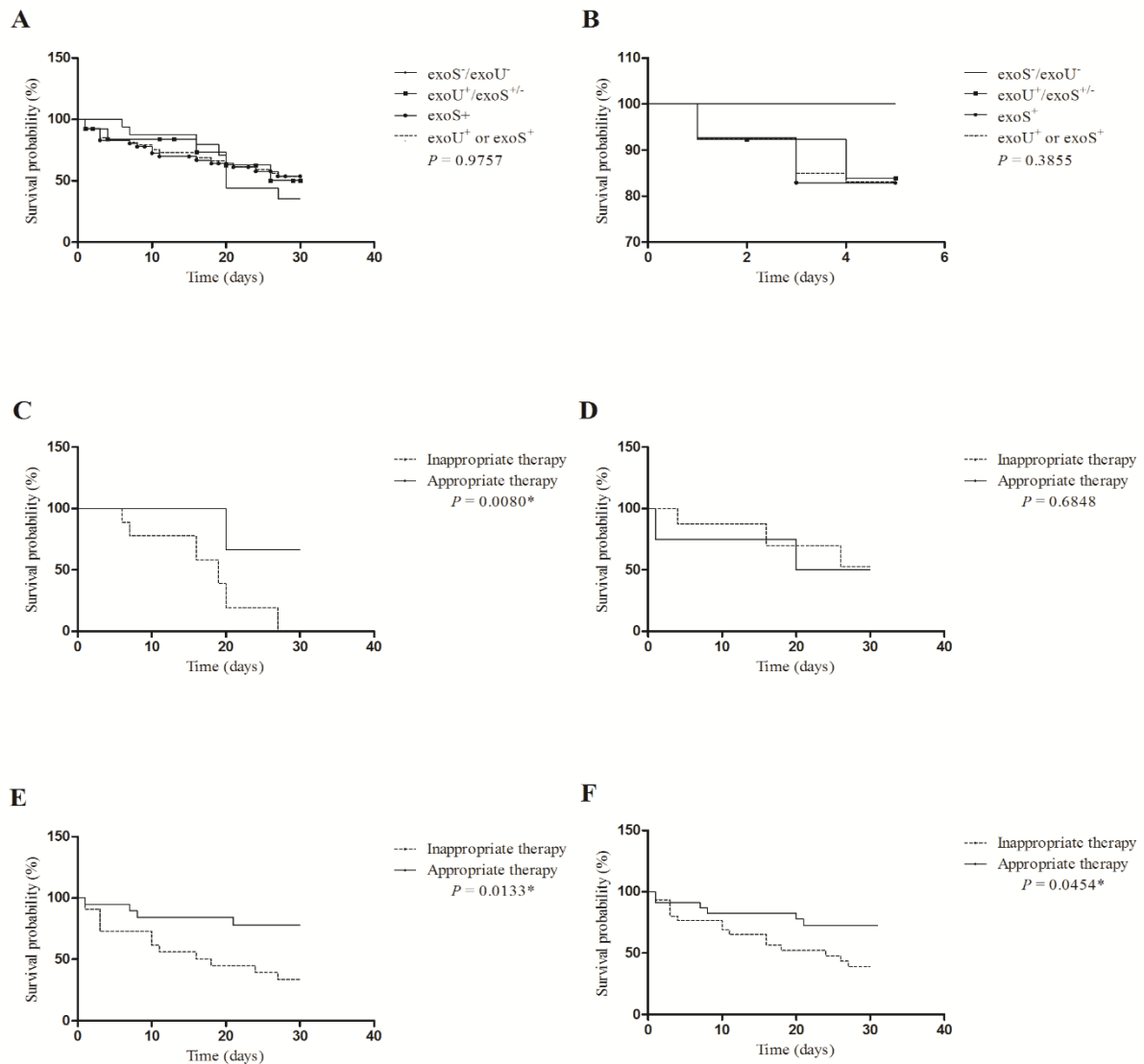


Figure 1: Survival curve using the Kaplan–Meier method – **A:** 30-day mortality among groups of patients with infection *P. aeruginosa* *exoS*⁻/*exoU*⁻, *exoU*⁺/*exoS*^{+/-}, *exoS*⁺ and *exoU*⁺ or *exoS*⁺. **B:** 5-day mortality among groups of patients with infection *P. aeruginosa* *exoS*⁻/*exoU*⁻, *exoU*⁺/*exoS*^{+/-} *exoS*⁺ and *exoU*⁺ or *exoS*⁺. **C:** for patients with *exoS*⁻/*exoU*⁻ *P. aeruginosa* infection who received antimicrobial appropriate therapy compared with those who received inappropriate empirical therapy. **D:** for patients with *exoU*⁺/*exoS*^{+/-} *P. aeruginosa* infection who received antimicrobial appropriate therapy compared with those who received inappropriate empirical therapy. **E:** for patients with *exoS*⁺ *P. aeruginosa* infection who received antimicrobial appropriate therapy compared with those who received inappropriate empirical therapy. **F:** for patients with *exoU*⁺ or *exoS*⁺ *P. aeruginosa* infection who received antimicrobial appropriate therapy compared with those who received inappropriate empirical therapy.

DISCUSSION

Although considered an opportunistic pathogen, the resistance and virulence of *P. aeruginosa* may severely impact patients' clinical conditions. Understanding the T3SS factors responsible for the severity and mortality of *P. aeruginosa* infections is of paramount relevance [1,2]. In this series, we investigated the presence of the T3SS genotype in 76 isolates of carbapenem resistant *P. aeruginosa* isolated from different anatomical sites and tried to establish the risk factors for infections with more aggressive strains. Thus, we found that *exoS*⁺ was the most frequent genotype, followed by *exoU*⁺, corroborating with previous findings, in which the frequency of *exoU*⁺ was between 10% to 40% [11,16,17].

More than two thirds of the isolates expressed the *exoU* and *exoS* genes. Interestingly, 4 isolates possessing both *exoU* and *exoS* genes were detected simultaneously, which is a notable finding since *exoU* and *exoS* appear to be mutually exclusive in different *P. aeruginosa* populations in human and environmental isolates [8,11,17]. Type III secretion system genotypes were obtained by PCR assays and most isolates possess factors associated with T3SS *exoS*. Garey et al. (2008) reported that *exoU* and *exoS* are more frequent in bloodstream infections [18]. The study by Subedi et al. (2018) and collaborators found that the majority of isolates recovered from non-invasive infections, such as conjunctivitis and ocular keratitis had T3SS virulence genes, especially *exoU* [19]. In this study, even though most of the isolates have been recovered from tracheal secretion, we observed that bloodstream infections were caused significantly by more virulent strains, directly impacting early mortality, since 45.5% of patients with bacteremia due to *exoU*⁺ or *exoS*⁺ strains died in up to 30 days after diagnosis of the infection, with an early mortality rate of 27.3% (data not shown). These findings confirm reports in the literature, which say that patients with infection by *P. aeruginosa* *exoU*⁺ have a worse prognosis [8,11,17].

In some Brazilian hospitals, the resistance in *P. aeruginosa* to carbapenems and multidrug resistance are a big problem, with frequencies up 30% for MDR and XDR isolates [7], and carbapenem resistance mainly occurs by production of MBL, mainly SPM-1 enzyme [11,20]. In this study, we found a high relationship between the presence of MBL and T3SS production, since all isolates were positive for at least one T3SS genotype.

The relationship between multidrug resistance and *exoS* or *exoU* genotype is already reported [11,19,21]. In this study, we observed a high relationship between the presence of the *exoS* genotype and multidrug resistance, which may justify the significant impact of

inappropriate empirical therapy on 30-day mortality in the group of patients with infection by *exoS*⁺ strains, due to the limitation of effective therapeutic options. According to literature, the co-occurrence of inappropriate empirical therapy and MDR *P. aeruginosa* are frequent in patients with HAI worldwide [3,22], but with higher rates in countries with low-resources, as Brazil [6,11].

Strains showing a high-virulence phenotype (ExoU) tended to be associated with underlying conditions [8,17], whereas, the analysis of this cohort revealed that bacterial virulence T3SS itself was not a major player driving mortality in *P. aeruginosa* infections. Several factors could explain this lack of impact. First, small sample cohort and high frequency of MDR phenotypes, because MDR phenotypes are associated with higher 30-day mortality, probably due to inappropriate empirical therapy. Although we have not observed a significant association between T3SS genotype we observed that strains showing a *exoU* and *exoS* phenotype tended to have higher mortality early (5-day) mortality and this was not documented.

Our study presents some limitations. First, this is a retrospective study conducted in a single tertiary care hospital in Brazil. Therefore, the results may not be generalized to other institutions and/or countries. However, we believe that a single-center study design is preferred when studying the sole effect T3SS genotype expression and evaluate its relationship with early mortality and inappropriate empirical therapy. Second, it is easier to collect data and clinical isolates for analysis and attempt to determine endemic strains in studies conducted in a single hospital. One of the strengths of our study is that, despite being a single-center study, a large group of patients was evaluated.

In conclusion, our results indicate that the T3SS in *P. aeruginosa* virulence genotype correlates MDR profile, but a poor prognostic was associated with inappropriate empirical therapy regardless of T3SS genotype.

Acknowledgments

We thank the patients of the Clinical Hospital of the Federal University of Uberlandia who consented to participate in the study and the staff members for their cooperation.

Funding sources

This research received funding from public agencies dedicated to the promotion of scientific and technological research, as follows: Minas Gerais State Agency for Research and

Development (FAPEMIG)/PPSUS (Nº APQ-04062-17) and National Council for Scientific and Technological Development (CNPQ). (Nº 428397/2018-2).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- [1] Botelho J, Grosso F, Peixe L. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* - Mechanisms, epidemiology and evolution. *Drug Resist Updat*. 2019;44:100640. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2019.07.002>
- [2] Horcajada JP, Montero M, Oliver A, et al. Epidemiology and Treatment of Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Clin Microbiol Rev*. 2019;32:e00031-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00031-19>
- [3] Montero MM, López Montesinos I, Knobel H, et al. Risk Factors for Mortality among Patients with *Pseudomonas aeruginosa* Bloodstream Infections: What Is the Influence of XDR Phenotype on Outcomes? *J Clin Med*. 2020;9:514. doi: <https://doi.org/10.3390/jcm9020514>.
- [4] Balkhair A, Al-Muharrmi Z, Al'Adawi B, et al. Prevalence and 30-day all-cause mortality of carbapenem-and colistin-resistant bacteraemia caused by *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella pneumoniae*: Description of a decade-long trend. *Int J Infect Dis*. 2019;85:10–15. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.05.004>
- [5] Martinez-Nadal G, Puerta-Alcalde P, Gudiol C, Cardozo C, et al. Inappropriate empirical antibiotic treatment in high-risk neutropenic patients with bacteremia in the Era of Multidrug Resistance. *Clin Infect Dis*. 2020;70:1068–74. doi: <https://doi.org/10.1093/cid/ciz319>.
- [6] Rossi Gonçalves I, Dantas RCC, Ferreira ML, Batistão DWDF, Gontijo-Filho PP, Ribas RM. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: association with virulence genes and biofilm formation. *Braz J Microbiol*. 2017;48:211-217. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.11.004>
- [7] Santos ICO, Pereira de Andrade NF, da Conceição Neto OC, et al. Epidemiology and antibiotic resistance trends in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Rio de Janeiro - Brazil: Importance of mutational mechanisms over the years (1995-2015). *Infect Genet Evol*. 2019; 73:411-415. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.05.015>
- [8] Takata I, Yamagishi Y, Mikamo H. Association of the exoU genotype with a multidrug non susceptible phenotype and mRNA expressions of resistance genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Chemother*. 2018;24:45-52. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2017.08.018>

- [9] El-Solh AA, Hattemer A, Hauser AR, Alhajhusain A, Vora H. Clinical outcomes of type III *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. *Crit Care Med*. 2012; 40:1157-63. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3182377906>
- [10] Hauser AR. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat Rev Microbiol*. 2009; 7:654–665. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2199>
- [11] Ferreira ML, Dantas RC, Faria ALS, et al. Molecular epidemiological survey of the quinolone- and carbapenem-resistant genotype and its association with the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol*. 2015; 64:262-271. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000023>
- [12] Gilbert DN, Sande MA, Moellering RC, Eliopoulos GM. The Sanford guide to antimicrobial therapy 2007. Sperryville, VA: Antimicrobial Therapy Incorporated, 37th ed., 2007.
- [13] Daikos GL, Tsaousi S, Tzouveleki LS, et al. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections: lowering mortality by antibiotic combination schemes and the role of carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014; 5:2322-8. <https://doi.org/10.1128/AAC.02166-13>
- [14] Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012; 18:268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- [15] Urzedo JE, Menezes RP, Ferreira ML, et al. High mortality by Nosocomial Infections caused by carbapenem-resistant *P. aeruginosa* in a referral hospital in Brazil: Facing the perfect storm. *J Med Microbiol*. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001273>
- [16] Khodayary R, Nikokar I, Mobayen MR, et al. High incidence of type III secretion system associated virulence factors (exoenzymes) in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Iranian burn patients. *BMC Res Notes*. 2019; 12:28. doi: 10.1186/s13104-019-4071-0. <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4071-0>
- [17] Horna G, Amaro C, Palacios A, Guerra H, Ruiz J. High frequency of the exoU+/exoS+ genotype associated with multidrug-resistant “high-risk clones” of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Peruvian hospitals. *Sci Rep*. 2019; 9:10874. doi: 10.1038/s41598-019-47303-4. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47303-4>
- [18] Garey KW, Vo QP, Larocco MT, Gentry LO, Tam VH. Prevalence of type III secretion protein exoenzymes and antimicrobial susceptibility patterns from bloodstream isolates of patients with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. *J Chemother*. 2008;20:714-20. <https://doi.org/10.1179/joc.2008.20.6.714>
- [19] Subedi D, Vijay AK, Kohli GS, Rice SA, Willcox M. Association between possession of ExoU and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One*. 2018; 13:e0204936. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204936>
- [20] Jácome PRLA, Alves LR, Jácome-Júnior AT, et al. Detection of blaSPM-1, blaKPC, blaTEM and blaCTX-M genes in isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. and *Klebsiella* spp. from cancer patients with healthcare-associated infections. *J Med Microbiol*. 2016; 65:658–665. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000280>

[21] Agnello M, Wong-Beringer A. Differentiation in quinolone resistance by virulence genotype in *Pseudomonas aeruginosa*. PLoS One. 2012; 7:e42973. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042973>

[22] Garcia-Vidal C, Cardozo-Espinola C, Puerta-Alcalde P, et al. Risk factors for mortality in patients with acute leukemia and bloodstream infections in the era of multiresistance. PLoS One. 2018; 13: e0199531. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199531>.

Capítulo VII

Conclusão e Considerações Finais

Diante dos resultados deste estudo, conclui-se que:

- 50% dos pacientes incluídos no estudo evoluíram para o óbito, demonstrando que *P. aeruginosa* ainda é um microrganismo epidemiologicamente importante no país, já que é responsável por infecções em diversos sítios anatômicos e está associado elevadas taxas de mortalidade;
- O sítio mais acometido foi o pulmão (37,8%), seguido de corrente sanguínea (33,2%) e trato urinário (11,4%);
- A maioria dos pacientes incluídos no estudo apresentaram infecção por *P. aeruginosa* MDR (59,5%);
- Pacientes com comorbidades que desenvolveram infecções por *P. aeruginosa* apresentaram maiores chances de receberem Terapia empírica inapropriada e a taxa de mortalidade foi significativamente maior entre os pacientes submetidos a Terapia empírica inapropriada (75,5%);
- Foram considerados fatores de risco para mortalidade até cinco dias após o diagnóstico de infecção: o tempo de hospitalização prolongado; a presença de comorbidades como: neoplasia, nefropatia e cardiopatia; uso de dispositivos invasivos, dentre eles: sonda vesical e nutrição parenteral e terapia antimicrobiana inapropriada;
- A frequência dos genes que codificam as metalo- β -lactamases foi muito baixa (7,9%), sendo o gene *bla_{SPM}* o mais frequente;
- 64.5% dos isolados apresentaram gene T3SS, sendo a *exoT* o gene mais comum. Apesar da frequência do gene *exoU* na nossa casuística ter sido relativamente baixa, esse genótipo foi significativamente mais frequente entre isolados MDR e associado a maior mortalidade entre os pacientes.

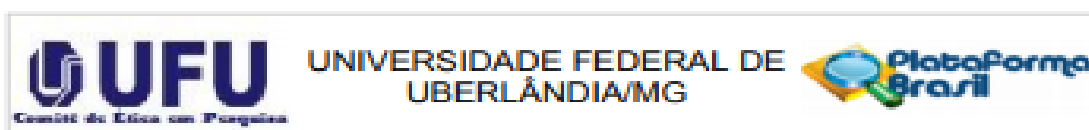
Estes resultados demonstram que *P. aeruginosa* continua sendo um dos patógenos mais importantes no ambiente hospitalar, acometendo na sua maioria pacientes críticos. Aqui, percebemos que a terapia antimicrobiana está intimamente relacionada com o pior prognóstico dos pacientes principalmente naqueles com infecções mais graves como ICS e pneumonia. Nossos resultados sugerem também que a multirresistência associada com virulência deve ser adicionada à lista de fatores responsáveis para o aumento das taxas de mortalidade nesses pacientes.

Além disso, nota-se um aumento da resistência antimicrobiana dos isolados recuperados, o que dificulta a escolha do tratamento adequado e promove o aumento das taxas de mortalidade. Esse aumento de *P. aeruginosa* resistente encontrado neste estudo chama a atenção para o uso indiscriminado e incorreto de antimicrobianos, que resultam na seleção de isolados resistentes.

Assim, nossos achados revelam uma rápida disseminação de microrganismos multirresistentes, limitando de forma significativa as opções de tratamento. Apontam uma necessidade urgente de melhora na vigilância, terapêutica antimicrobiana mais racional e sobretudo de foco em estratégias de controle de infecção mais efetivas.

Portanto, conhecer os mecanismos de resistência de uma bactéria importante como *P. aeruginosa* é extremamente importante não só para traçar estratégias de controle de IRAS, como ainda para estabelecer uma terapia antimicrobiana eficaz. Diante disso, deve ser incentivado a realização de pesquisas semelhantes a essa no intuito de permitir que tanto Comissões de Controle de Infecção Hospitalar, como ainda os profissionais de saúde que lidam diretamente com os pacientes de risco e órgãos competentes conheçam a e compreendam a epidemiologia e dinâmica das IRAS e, consigam traçar medidas de controle e prevenção das mesmas.

ANEXO A – PARECER COMITÊ DE ÉTICA COM PESQUISA EM SERES HUMANOS – UFU



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Bacteremias por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes: disseminação clonal associada ao sistema de secreção tipo III e sua relação com a evolução clínica.

Pesquisador: Jane Elre Urzedo

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 77541517.9.0000.5152

Instituição Proponente: HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS

DADOS DO PARECER

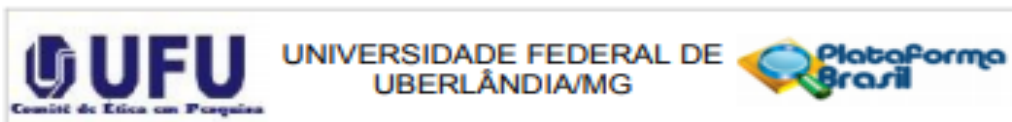
Número do Parecer: 2.527.621

Apresentação do Projeto:

Segundo as pesquisadoras:

As Infecções de Corrente Sanguínea (ICS) estão entre as complicações infecciosas mais frequentes e graves decorrente de hospitalização e cuidados médicos. A presença de bactéria na corrente sanguínea é de grande importância clínica, demonstrando que o hospedeiro não pôde controlar a infecção a partir de um foco primário ou não está recebendo terapia empírica antimicrobiana apropriada. *Pseudomonas aeruginosa* tem sido uma grande ameaça nos últimos anos para a população hospitalizada com infecções graves, especialmente para indivíduos com comprometimento do sistema imunológico. A importância clínica desse micro-organismo está associada com sua difícil erradicação e contínuos fracassos terapêuticos, uma vez que as opções disponíveis para o tratamento de infecções causadas por esse são limitadas em virtude da alta incidência de cepas multirresistentes e panresistentes. Além da multirresistência aos antimicrobianos, *P. aeruginosa* expressa vários determinantes de virulência, mas o Sistema de Secreção Tipo III (TTSS) tem sido implicado como fator importante na patogênese de infecções graves por esse micro-organismo. Esse sistema permite que a bactéria introduza citotoxinas (ExoS, ExoU, ExoY e ExoT) na célula do hospedeiro fazendo com que ela consiga evadir das defesas do sistema imune. Diante disso, os objetivos do presente estudo são: realizar estudo

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 2.527.621

epidemiológico molecular de infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos associadas às bacteremias nosocomiais no HC-UFU, a fim de compreender melhor os mecanismos de resistência, a virulência e atual disseminação de clones de alto risco em cepas clínicas associadas a *P. aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos; avaliar a ocorrência de bacteremias por *P. aeruginosa* diagnosticadas no HC-UFU; avaliar os principais preditores de mortalidade e o impacto da terapia antimicrobiana inapropriada na evolução clínica dos pacientes; determinar os genes responsáveis por codificarem as metalo-lactamases (*blaIMP*, *blaVIM*, *blaSIM*, *blaGIM*, *blaSPM* e *blaNDM*); avaliar a disseminação de clones de *P. aeruginosa* produtoras de metalo-lactamases em diferentes clínicas do HC-UFU; determinar a frequência dos genes codificadores das exotoxinas do Sistema de Secreção Tipo III (*exoS*, *exoT*, *exoU* e *exoY*); avaliar a disseminação de clones de *P. aeruginosa* produtoras de metalo-lactamases em diferentes clínicas do HC-UFU.

Metodologia

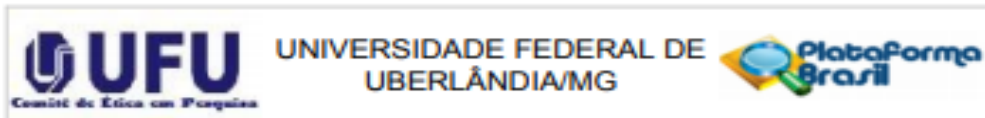
Será realizado estudo retrospectivo através de vigilância ativa no Serviço de Controle de Infecção Hospitalar (SCIH) e Laboratório de Microbiologia do HC-UFU (detecção de pacientes com bacteremia por *Pseudomonas aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos) no Hospital de Clínicas de Uberlândia, o período de obtenção das amostras de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos será a partir da aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa -UFU(CEP).

A identificação dos micro-organismos e a suscetibilidade antimicrobiana será realizada utilizando-se o sistema automatizado VITEK®2 (bioMérieux) no setor de Microbiologia do Laboratório de Análises Clínicas do HC-UFU. As amostras de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos serão encaminhadas para o Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) e cultivadas em TrypticSoy Agar (TSA).

Será conduzido um estudo Caso X Controle entre os pacientes com infecção para detecção dos fatores de risco associados com a mortalidade em 30 dias e o impacto da terapia inapropriada na evolução dos pacientes com bacteremia. Será contabilizado apenas o primeiro episódio de bacteremia por *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos para cada paciente incluído no estudo.

Será extraído o DNA genômico dos isolados de *P. aeruginosa* pela técnica de extração do DNA por

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.405-144
UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 2.527.621

lise térmica e os clones serão avaliados pela técnica de Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE).

Um estudo Caso X Controle será conduzido para detecção de fatores relacionados à evolução de pacientes com infecção pela cepa produtora da citotoxina ExoU. Os dados demográficos, clínicos e epidemiológicos dos pacientes serão obtidos através da vigilância ativa no Serviço de Controle de Infecção Hospitalar (SCIH), por meio de fichas identificadas por números, não sendo usados os prontuários desses pacientes de amostras recuperadas no Laboratório de Microbiologia .

Critério de Inclusão:

Serão incluídas todas as hemoculturas positivas para *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos.

Critério de Exclusão:

Serão excluídos as hemoculturas negativas para *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO PRIMÁRIO/GERAL:

Realizar estudo epidemiológico molecular de infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos associadas às bacteremias nosocomiais no HC-UFU, a fim de compreender melhor os mecanismos de resistência, a virulência e atual disseminação de clones de alto risco em cepas clínicas associadas a *P. aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos.

OBJETIVO SECUNDÁRIO/ESPECÍFICOS:

- 1 - Avaliar a ocorrência de bacteremias por *P. aeruginosa* diagnosticadas no HC-UFU;
- 2 - Avaliar os principais preditores de mortalidade e o impacto da terapia antimicrobiana inapropriada na evolução clínica dos pacientes; bem como naqueles pacientes com infecção por *P. aeruginosa* produtora de exoU.
- 3 - Determinar os genes responsáveis por codificarem as metalo--lactamases (*blaIMP*, *blaVIM*, *blaSIM*, *blaGIM*, *blaSPM* e *blaNDM*);
- 4 - Avaliar a disseminação de clones de *P. aeruginosa* produtoras de metalo--lactamases em diferentes clínicas do HC-UFU;
- 5 - Determinar a frequência dos genes codificadores das exotoxinas do Sistema de Secreção Tipo

Endereço: Av. João Neves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
 Bairro: Santa Mônica CEP: 38.405-144
 UF: MG Município: UBERLÂNDIA
 Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4335 E-mail: cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 2.527.621

III (exoS, exoT, exoU e exoY);

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os pesquisadores:

RISCOS: O único risco seria o de identificação dos participantes da pesquisa, no entanto serão tomados cuidados a fim de manter o sigilo dos participantes, uma vez que as fichas não serão nomeadas e sim identificadas por números.

BENEFÍCIOS: Os benefícios esperados são: avaliar a disseminação de clones de *P. aeruginosa* produtoras de metalo-lactamases em diferentes clínicas do HC-UFU, bem como avaliar os principais preditores de mortalidade e o impacto da terapia antimicrobiana inapropriada na evolução clínica dos pacientes, a fim de contribuir com a proposição de soluções aos gestores de modo a conter a disseminação de *P. aeruginosa* multirresistente no HC-UFU.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa com relevância científica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta os termos obrigatórios.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A pesquisadora atendeu as pendências apontadas no parecer nº2.466.200 de 12 de Janeiro de 2018. Entretanto, não foram retiradas as informações citadas no parecer que constam do item desenho experimental.

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, o CEP manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

Considerações Finais a critério do CEP:

Data para entrega de Relatório Parcial ao CEP/UFU: Agosto de 2019.

Data para entrega de Relatório Final ao CEP/UFU: Agosto de 2020.

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
 Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144
 UF: MG Município: UBERLÂNDIA
 Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4335 E-mail: cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 2.527.621

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

O CEP/UFU lembra que:

- a- segundo a Resolução 466/12, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.
- c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução CNS 466/12, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Orientações ao pesquisador :

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 466/12) e deve receber uma via original do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS 466/12), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS 466/12). É papel de o pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res.251/97, Item III.2.e).

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
 Bairro: Santa Mônica CEP: 38.405-144
 UF: MG Município: UBERLÂNDIA
 Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4335 E-mail: cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 2.527.621

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_889006.pdf	11/02/2018 23:40:37		Aceito
Outros	PENDENCIADOCUMENTALcorrigido.docx	11/02/2018 23:34:58	jane eire urzedo	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_JANE_EIRE_PLATAFORMA_BRASILcorrigido.docx	11/02/2018 23:33:42	jane eire urzedo	Aceito
Outros	fichaindividual.docx	04/08/2017 00:17:41	jane eire urzedo	Aceito
Folha de Rosto	Folha_De_Rosto_JaneEire.pdf	04/08/2017 00:01:10	jane eire urzedo	Aceito
Outros	termoCompromissoPesquisadores.jpg	30/06/2017 13:35:21	jane eire urzedo	Aceito
Outros	LinkDosCurriculos.docx	22/06/2017 18:35:14	jane eire urzedo	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

UBERLÂNDIA, 06 de Março de 2018

Assinado por:
Sandra Terezinha de Farias Furtado
(Coordenador)

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121 - Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144
UF: MG Município: UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4335 E-mail: cnp@propp.ufu.br

ANEXO B – FICHA EPIDEMIOLÓGICA

Clínica do HC-UFU: _____ **Data:** ___/___/___

Iniciais do nome: _____ **Prontuário:** _____

Gênero:() M () F **Idade:** _____

Admissão: ___/___/___ **Saída:** ___/___/___ () alta () transferência () óbito

Movimentação no hospital: DESTAQUE TEMPO UTI (TEMPO HOSPITALIZAÇÃO ATÉ O DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO

Unidade: _____ Admissão: ___/___/___ Saída: ___/___/___

Unidade: _____ Admissão: ___/___/___ Saída: ___/___/___

Unidade: _____ Admissão: ___/___/___ Saída: ___/___/___

Doença(s) de base: _____

Procedimento(s) realizado(s): _____

Dispositivos: () VM () SVD () CVC () SNG ou SNE () Drenos
() NPP() () HEMODIÁLISE

Outros () -----

Diagnóstico principal: _____

Co-morbidades:

() Doença cardíaca () Doença pulmonar () Doença renal () Doença hepática
() Diabetes mellitus () Doença do SNC () Neoplasia () Aids () Trauma
() Outra(s): _____

Antimicrobianos:() N () S VIGÊNCIA DA INFECÇÃO

1. _____	de ___/___/___ a ___/___/___	total: _____ dias
2. _____	de ___/___/___ a ___/___/___	total: _____ dias
3. _____	de ___/___/___ a ___/___/___	total: _____ dias
4. _____	de ___/___/___ a ___/___/___	total: _____ dias
5. _____	de ___/___/___ a ___/___/___	total: _____ dias
6. _____	de ___/___/___ a ___/___/___	total: _____ dias
7. _____	de ___/___/___ a ___/___/___	total: _____ dias
8. _____	de ___/___/___ a ___/___/___	total: _____ dias

TERAPIA PRÉVIA 30 DIAS ANTES DA INFECÇÃO