

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Silvana Oliveira dos Santos

**INVESTIGAÇÃO DA RESISTÊNCIA BACTERIANA E AVALIAÇÃO
DE METODOLOGIAS EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas
aeruginosa* E *Acinetobacter* spp. DE DIFERENTES ANOS EM UM
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO**

Santa Maria, RS
2017

Silvana Oliveira dos Santos

**INVESTIGAÇÃO DA RESISTÊNCIA BACTERIANA E AVALIAÇÃO DE
METODOLOGIAS EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa* E
Acinetobacter spp. DE DIFERENTES ANOS EM UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Ciências Farmacêuticas**.

Orientadora Prof. Dr^a.: Rosmari Hörner

Santa Maria, RS
2017

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Santos, Silvana Oliveira dos
Investigação da resistência bacteriana e avaliação de metodologias em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. de diferentes anos em um Hospital Universitário / Silvana Oliveira dos Santos.- 2017.
84 f.; 30 cm

Orientadora: Rosmari Hörner
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2017

1. *Pseudomonas aeruginosa* 2. *Acinetobacter* spp. 3. Resistência 4. Colistina 5. Carbapenêmicos.
Metodologias. I. Hörner, Rosmari II. Título.

© 2017

Todos os direitos autorais reservados a Silvana Oliveira dos Santos. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: sil.o.santos@bol.com.br

Silvana Oliveira dos Santos

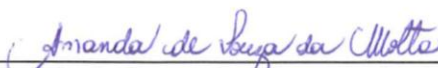
**INVESTIGAÇÃO DA RESISTÊNCIA BACTERIANA E AVALIAÇÃO DE
METODOLOGIAS EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa* E
Acinetobacter spp. DE DIFERENTES ANOS EM UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Ciências Farmacêuticas**.

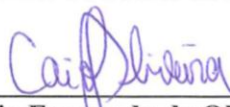
Aprovado em 28 de abril de 2017:



Rosmari Hörner, Dr^a. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)



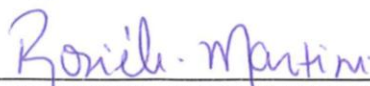
Amanda de Souza da Motta, Dr^a. (UFRGS)



Caio Fernando de Oliveira, Dr. (UNISC)



Cláudia de Mello Bertoncheli dos Santos, Dr^a. (UFSM)



Rosieli Martini, Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, RS
2017

*Dedico este trabalho à minha amada família,
meus pais **João e Neiva**,
meus irmãos **Gustavo e Naiana** e
meu noivo **Tiago**,
obrigada por todo amor, carinho e companheirismo em todos os momentos.*

AGRADECIMENTOS

Ao longo de uma trajetória, o ser humano nunca está sozinho para atingir seus objetivos. Neste caminho, existem possibilidades, tropeços, conhecimento compartilhado, acertos, erros, no entanto é necessário ter a coragem para levantar-se e começar novamente o caminho e assim nunca desistir. Ao encerrar um ciclo não há maior prazer no mundo do que agradecer algumas pessoas que contribuíram para finalização deste trabalho, hoje todas as dificuldades são esquecidas, mesmo que momentaneamente e novos objetivos são traçados para que o ser humano recomece sua trajetória novamente, assim merecem um agradecimento especial...

Deus... pela vida, saúde e a luz no caminho, por me fortalecer a cada manhã. Sei que Ele está atento às minhas orações e assim proporciona as oportunidades para meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Aos meus pais, João e Neiva, que sempre acreditaram em mim, por suas lutas diárias enfrentadas para garantir minha educação e ajudar na formação da pessoa que me tornei. Devo minha vida a vocês!

Aos meus irmãos Gustavo e Naiana, por serem meus confidentes e amigos, sempre me apoiando e dando força... pelos momentos de descontração que me proporcionam e por me deixarem fazer parte da vida de vocês! Amo vocês!

Ao meu noivo Tiago, por tudo: amor, respeito, compreensão, auxílio e companheirismo em todas as horas. Sem sua ajuda teria sido mais difícil e não teria tanta força para ir até o fim. Não há como mensurar o meu amor, respeito e carinho por você!

A todos os meus familiares, que vibram com nossas vitórias.

À minha orientadora, Prof. Dr^a. Rosmari Hörner por todas as oportunidades concedidas, desde a graduação como sua bolsista de iniciação até a conclusão desta tese, por todo apoio e confiança a mim dispensados. Agradeço muito pelos valiosos conselhos de seguir em frente e aproveitar as oportunidades que a vida nos oferece. Seu conhecimento e a dedicação em tudo que fazes.... principalmente a tarefa de ensinar me fazem ver na senhora o melhor exemplo a seguir! Muito obrigada Prof.!

A todo o pessoal que passou e que continua no nosso Laboratório de Bacteriologia (LABAC/CCS)... meus companheiros de pesquisas, bolsistas de iniciação científica e amigos.... foram alguns anos de ótima companhia, momentos de diversão e descontração além muitos experimentos e um enorme aprendizado. É muito bom ter todos vocês ao meu lado!

Agradeço também aos meus amigos de São Luiz Gonzaga, as amigas da 98ª turma de Farmácia: Carla, Fernanda, Fabianne, Julia, Priscila e Tatiana por estarem sempre me acompanhando e entendendo a minha ausência em alguns momentos de diversão. Aos colegas de doutorado, por compartilhar das mesmas dificuldades e tornarem a convivência uma experiência enriquecedora.

À comissão examinadora desta tese que se dispôs gentilmente a avaliar e qualificar este trabalho.

À Universidade Federal de Santa Maria, a todos os professores do Curso de Farmácia e do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, ao Hospital Universitário de Santa Maria e às farmacêuticas do Setor de Microbiologia do Laboratório de Análises Clínicas, que compartilharam conhecimento e proporcionaram a execução deste trabalho.

Muito Obrigada!

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus,
não sou o que era antes.”*

Martin Luther King

RESUMO

INVESTIGAÇÃO DA RESISTÊNCIA BACTERIANA E AVALIAÇÃO DE METODOLOGIAS EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa* E *Acinetobacter* spp. DE DIFERENTES ANOS EM UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO

AUTORA: Silvana Oliveira dos Santos

ORIENTADORA: Rosmari Hörner

Pseudomonas aeruginosa e *Acinetobacter* spp. são microrganismos relatados mundialmente como patógenos de elevada prevalência na etiologia de infecções nosocomiais, são oportunistas e possuem importância clínica nas Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde. A elevada resistência aos antimicrobianos que estas espécies apresentam é um grande desafio na medicina atual. Sendo assim, o presente trabalho objetivou investigar a resistência bacteriana em isolados de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. coletados em dois períodos (agosto de 2011 e janeiro de 2012 e agosto de 2015 a janeiro de 2016) oriundos de um hospital universitário no sul do Brasil, bem como avaliar metodologias para identificação da resistência ao meropenem em isolados da coleção de 2011/2012 e identificar a resistência a colistina nos isolados da coleção 2015/2016. Nesta pesquisa foram incluídos 63 isolados de *P. aeruginosa* e 39 de *Acinetobacter* spp. (2011/2012), assim como 231 de *P. aeruginosa* e 62 de *Acinetobacter* spp. (2015/2016) de diversos espécimes clínicos provenientes do Hospital Universitário de Santa Maria, Rio Grande do Sul. Realizaram-se as análises dos perfis de resistência aos antimicrobianos em todos os isolados clínicos dos anos de 2011/2012 e 2015/2016 e a investigação da resistência à colistina nos isolados da coleção de 2015/2016 por meio do teste de suscetibilidade aos antimicrobianos em sistema automatizado VITEK[®]2-bioMérieux. As metodologias de difusão do disco e as automatizadas MicroScan[®]-SIEMENS e VITEK[®]2-bioMérieux foram avaliadas estatisticamente quando comparadas a metodologia de microdiluição em caldo, técnica considerada padrão para identificação da resistência ao carbapenêmico meropenem. Na avaliação do perfil dos isolados, detectou-se redução na resistência ao imipenem e meropenem em *P. aeruginosa* de 64,10% para 53,24%, de 2011/2012 para 2015/2016. Nos *Acinetobacter* spp. também foi observada esta diminuição, de 88,57% para 74,19% entre os dois períodos. Em relação à avaliação das metodologias para identificação da resistência ao carbapenêmico meropenem nos isolados de 2011/2012, a difusão do disco apresentou 91% de sensibilidade, 77% de especificidade e 86% de acurácia, demonstrando boa concordância com o método padrão (Kappa (K) = 0,688), enquanto a metodologia automatizada MicroScan[®]-SIEMENS apresentou 100%, 77% e 92%, respectivamente para os mesmos quesitos anteriores e a concordância foi maior (K = 0,820 - ótima concordância). Já a metodologia automatizada VITEK[®]2-bioMérieux a sensibilidade foi de 97%, 55% de especificidade e 82% de acurácia e o índice foi considerado regular (K = 0,577). Foi identificada a resistência à colistina nos isolados de 2015/2016 em nove cepas de *P. aeruginosa* (9/231-3,89%) e nenhum *Acinetobacter* spp.. A partir do perfil de resistência dos isolados avaliados, pode-se concluir que *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp., de 2015/2016 mostraram-se mais sensíveis frente a grande maioria dos antimicrobianos testados, contudo, foi identificado a presença da resistência a colistina nestas cepas, fato que é impactante pois este antimicrobiano constitui a principal opção terapêutica para o tratamento de bactérias multirresistentes. Os dados deste estudo, permitem recomendar a associação de metodologias para identificação correta da resistência ao carbapenêmico meropenem, nesta pesquisa, a difusão do disco e MicroScan[®]-SIEMENS se mostraram boas metodologias para identificar este tipo de resistência. Além disso, os resultados obtidos mostram a necessidade do monitoramento contínuo de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. nosocomiais buscando minimizar a multirresistência nestes isolados e avaliar o padrão local de resistência.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*. *Acinetobacter* spp.. Resistência. Colistina. Carbapenêmicos. Metodologias.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF BACTERIAL RESISTANCE AND EVALUATION OF METHODOLOGIES IN CLINICAL ISOLATES OF *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. OF DIFFERENT YEARS IN A UNIVERSITY HOSPITAL

AUTHOR: SILVANA OLIVEIRA DOS SANTOS

ADVISOR: ROSMARI HÖRNER

Pseudomonas aeruginosa and *Acinetobacter* spp. are microorganisms worldwide reported as pathogens of high prevalence in the etiology of nosocomial infections; they are opportunistic and have clinical importance in Health Care Related Infections. The high resistance to antimicrobials that these species present is a major challenge in current medicine. Thus, the present work aimed to investigate bacterial resistance in isolates of *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. collected in two periods (August 2011 and January 2012 and August 2015 to January 2016) from a university hospital in southern Brazil, as well as to evaluate methodologies for the identification of resistance to meropenem in isolates from the 2011/2012 collection and to identify the resistance to colistin in the isolates of the 2015/2016 collection. In this study, 63 isolates of *P. aeruginosa* and 39 of *Acinetobacter* spp. (2011/2012), as well as 231 of *P. aeruginosa* and 62 of *Acinetobacter* spp. (2015/2016) of several clinical specimens from the University Hospital of Santa Maria, Rio Grande do Sul. Analyzes of antimicrobial resistance profiles in all clinical isolates from the years 2011/2012 and 2015/2016 and the investigation of resistance to colistin in the isolates of the 2015/2016 collection were carried out by the antimicrobial susceptibility test in VITEK[®]2-bioMérieux automated system. The disc diffusion methodologies and the automated MicroScan[®]-SIEMENS and VITEK[®]2-bioMérieux were evaluated statistically when comparing the methodology of microdilution in broth, a technique considered standard for the identification of resistance to carbapenem meropenem. In the evaluation of the profile of the isolates, a reduction in resistance to imipenem and meropenem in *P. aeruginosa* was detected from 64.10% to 53.24%, from 2011/2012 to 2015/2016. In *Acinetobacter* spp. this decrease was also observed, from 88.57% to 74.19% between the two periods. Concerning the evaluation of the methodologies for the identification of resistance to carbapenem meropenem in the 2011/2012 isolates, the diffusion of the disc presented 91% of sensitivity, 77% of specificity and 86% of accuracy, demonstrating good agreement with the standard method (Kappa K)= 0.688), while the automated methodology MicroScan[®]-SIEMENS presented 100%, 77% and 92%, respectively for the same previous items and the agreement was higher (K= 0.820 - excellent agreement). The VITEK[®]2-bioMérieux automated methodology was 97%, 55% specificity and 82% accuracy, and the index was considered regular (K = 0.577). The resistance to colistin in the isolates of 2015/2016 was identified in nine strains of *P. aeruginosa* (9/231-3,89%) and none *Acinetobacter* spp.. From the resistance profile of the evaluated isolates, it can be concluded that *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. from 2015/2016 were more sensitive against the great majority of antimicrobials tested, however, the presence of resistance to colistin in these strains, a fact that is shocking because this antimicrobial is the main therapeutic option for the treatment of multiresistant bacteria. The data from this study allow us to recommend the association of methodologies for the correct identification of resistance to carbapenem meropenem. In this study, disk diffusion and MicroScan[®]-SIEMENS proved to be good methodologies to identify this type of resistance. In addition, the results show the need for continuous monitoring of *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. to minimize the multidrug resistance in these isolates and to evaluate the local resistance pattern.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*. *Acinetobacter* spp.. Resistance. Colistin. Carbapenems. Methodologies.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> visualizada pelo método de coloração de Gram.....	19
Figura 2 –	Crescimento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em ágar nutriente.....	19
Figura 3 –	Crescimento de <i>Acinetobacter baumannii</i> em ágar McConkey.....	21
Figura 4 –	Mecanismos de resistência bacteriana.....	23

LISTA DE TABELAS

2 PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

2.1 Artigo 1

Table 1 – Sensitivity profile of 9 <i>P. aeruginosa</i> isolates resistant to colistin	36
--	----

2.2 Manuscrito 1

Table I – Resistance profile of <i>P. aeruginosa</i> (n= 39) and <i>Acinetobacter</i> spp. (n=35) isolates in 2011/2012 according to the automated system VITEK 2 [®]	43
Table II – Resistance profile of <i>P. aeruginosa</i> (n= 231) and <i>Acinetobacter</i> spp. (n=62) isolates in 2015/2016 according to the automated system VITEK 2 [®]	43
Table III – Age group of patients with isolates of <i>P. aeruginosa</i> and <i>Acinetobacter</i> spp. resistant to carbapenems	44
Table IV – Clinical specimens of <i>P. aeruginosa</i> and <i>Acinetobacter</i> spp. isolates resistant to carbapenems	44
Table V – Hospital unit of <i>P. aeruginosa</i> and <i>Acinetobacter</i> spp. isolates resistant to carbapenems	45

2.3 Manuscrito 2

Tabela 1 – Desempenho das metodologias testadas para identificação da resistência ao meropenem em isolados de <i>P. aeruginosa</i> e <i>Acinetobacter</i> spp. considerando a MC como padrão ouro	58
Tabela 2 – Tipos de erros produzidos e índice Kappa para cada metodologia testada para identificar a resistência ao meropenem em isolados de <i>P. aeruginosa</i> e <i>Acinetobacter</i> spp. considerando a MC como padrão ouro.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A. baumannii= *Acinetobacter baumannii*

AIM= Australian imipenemase

ANVISA= Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BGN=Bacilo Gram Negativo

BGN-NF= Bacilo Gram Negativo Não Fermentador

CCIH= Comissão de Controle de Infecção Hospitalar

CDC= *Center for Disease Control and Prevention*

CIM= Concentração Inibitória Mínima

CRAb= *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos

DIM-1= Dutch Imipenemase

E. coli= *Escherichia coli*

EDTA= Ácido etilenodiaminotetracético

ESKAPE= *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies de *Enterobacter*

GIM= German imipenemase

GN= Gram Negativo

GP= Gram Positivo

HUSM= Hospital Universitário de Santa Maria

IMP= Imipenemase

IRAS= Infecções Relacionadas à Assistência de Saúde

ITUs=Infecções do Trato Urinário

K. pneumoniae= *Klebsiella pneumoniae*

KHM= Kyroin University Hospital metalo- β -lactamase

KPC= *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

LACEN= Laboratório Central de Saúde Pública

MDRs= Multirresistentes

M β L= Metalo- β -lactamase

NDM-1= New Delhi metalo- β -lactamase

OMS= Organização Mundial da Saúde

OXA= Oxacilinas

P. aeruginosa= *Pseudomonas aeruginosa*

PBPs= *Penicilin Binding Proteins*

PCR= *Polymerase Chain Reaction*

RDC= Resolução da Diretoria Colegiada

SIM= Seoul imipenemase

SPM= São Paulo metalo- β -lactamase

UTI= Unidade de Tratamento Intensivo

VIM= Verona imipenemase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> : CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS, MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E PANORAMA ATUAL DA RESISTÊNCIA.....	18
1.2	<i>Acinetobacter</i> spp.: CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS, MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E PANORAMA ATUAL DA RESISTÊNCIA	21
1.3	RESISTÊNCIA BACTERIANA	22
1.3.1	Resistência aos carbapenêmicos	24
1.3.2	Resistência à colistina	27
1.4	OPÇÕES DE TRATAMENTO PARA INFECÇÕES POR MICRORGANISMOS MULTIRRESISTENTES	28
1.5	METODOLOGIAS AUTOMATIZADAS E CONVENCIONAIS PARA IDENTIFICAÇÃO DA RESISTÊNCIA EM MICRORGANISMOS.....	30
1.6	JUSTIFICATIVA	32
1.7	OBJETIVOS	33
1.7.1	Objetivo geral	33
1.7.2	Objetivos específicos	33
2	PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS	34
2.1	Artigo 1 - Letter to the Editor: Colistin resistance in non-fermenting Gram - negative bacilli in a university hospital	35
	Conflicts of interest	37
	Literatura citada - References	37
2.2	Manuscrito 1 - Assessment of resistance to carbapenems in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> and <i>Acinetobacter</i> spp. isolated in a tertiary hospital	39
	Abstract	40
	Introduction	40
	Materials And Methods	41
	Results	42
	Discussion	45
	Acknowledgements	48
	Literatura citada - references	48
2.3	Manuscrito 2 - Avaliação de metodologias para identificação da resistência ao meropenem em <i>P. aeruginosa</i> e <i>Acinetobacter</i> spp.	52
	Resumo	53
	Abstract	54
	Introdução	54
	Materiais e métodos	55
	Isolados clínicos	55
	Difusão do disco	55
	Microdiluição em caldo	56
	Suscetibilidade em sistema automatizado MicroScan[®]-SIEMENS e VITEK[®] 2-bioMérieux	56
	Análise dos dados	56
	Aspectos éticos	57
	Resultados e discussão	57
	Agradecimentos	60
	Literatura citada – Referências	61

3	DISCUSSÃO.....	63
4	CONCLUSÕES.....	68
	REFERÊNCIAS	70
	ANEXOS.....	79
	ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	79
	ANEXO B – PUBLICAÇÃO DO ARTIGO 1	82
	ANEXO C – SUBMISSÃO DO MANUSCRITO 1	84

APRESENTAÇÃO

Esta tese de doutorado está estruturada em seções dispostas na seguinte forma: **INTRODUÇÃO, PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES e REFERÊNCIAS.**

Os itens **MATERIAIS E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO DOS RESULTADOS e REFERÊNCIAS** se encontram inseridos no artigo e nos manuscritos que estão contidos na seção denominada **PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS** e representam a íntegra deste estudo.

O item **REFERÊNCIAS** se refere somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO e DISCUSSÃO** desta tese.

1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos que compõe o grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies de *Enterobacter*) constituem os principais agentes etiológicos causadores de infecções nosocomiais em todo o mundo (SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016). Entre esses patógenos, *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. se destacam como isolados multirresistentes (MDRs) e se apresentam como um dos maiores desafios na prática clínica, podendo colonizar e causar infecções oportunistas, em especial em pacientes graves submetidos a procedimentos invasivos (BRASIL, 2013a).

A disseminação crescente de microrganismos MDRs no ambiente nosocomial é um problema de impacto mundial, especialmente pela vulnerabilidade dos pacientes que se encontram em estado crítico e pela facilidade de propagação dos mecanismos de resistência entre esses patógenos (BRUSSELAERS; VOGELAERS; BLOT, 2011). Pesquisas sobre as terapias utilizadas em infecções microbianas por MDRs adquiridas tanto em nível comunitário quanto nosocomial têm despertado atenção dos profissionais de saúde (HIRSCH; TAM, 2010).

Um exemplo disso são os dados levantados pelo Programa de Vigilância Antimicrobiana SENTRY (*Antimicrobial Surveillance Program*) que avaliou a resistência nos bacilos Gram Negativos (GN) da América Latina entre os anos de 2008 – 2010 e evidenciou que *Acinetobacter* spp. coletados em diferentes regiões e de centros médicos localizados dentro de um mesmo país apresentavam um aumento significativo na taxa de resistência aos antimicrobianos carbapenêmicos, com destaque para o imipenem. Este estudo ainda apresentou a colistina (polimixina E) como o agente antimicrobiano mais ativo contra *Acinetobacter* spp. e *P. aeruginosa*, com taxas de suscetibilidade estáveis. Entretanto, no Brasil, alguns isolados de *P. aeruginosa* exibiram atividade reduzida à colistina e isolados de *Acinetobacter* spp., na Argentina, Brasil e México também mostraram suscetibilidade diminuída a este agente (GALES et al., 2012).

A descoberta de novos fármacos antimicrobianos é considerada como uma alternativa importante para conter o avanço deste grave problema de saúde pública que é a resistência aos antimicrobianos pelos microrganismos GN. Até o momento são limitadas as opções de tratamento para isolados MDRs (CAUMO et al., 2010).

Atualmente, a rápida propagação dos mecanismos de resistência aos antimicrobianos, por alguns microrganismos, no ambiente hospitalar, desempenham grande impacto no desfecho clínico dos pacientes (SHENG et al., 2010). Os antimicrobianos β -lactâmicos compõem uma classe de fármacos amplamente utilizada para o tratamento de infecções de bactérias Gram Positivas (GP) e GN. Estes fármacos caracterizam-se por possuir um anel β -lactâmico na sua estrutura molecular e incluem os seguintes grupos: derivados de penicilina, cefalosporinas, monobactâmicos, carbapenêmicos e inibidores de β -lactamase (BECEIRO; TOMÁS; BOU, 2013).

A expressão das enzimas β -lactamases consiste no principal mecanismo de resistência apresentado por *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. (DAS et al., 2016). Nestas bactérias, este mecanismo ocorre principalmente pela produção de enzimas que possuem capacidade de hidrolisar os carbapenêmicos (antimicrobianos mais utilizados no tratamento de isolados MDRs) (QUEENAN; BUSH, 2007). As β -lactamases do tipo metalo- β -lactamases (M β LS) e oxacilinases (NORDMANN; POIREL, 2002) são as carbapenemases mais frequentemente relatadas nestes isolados e o tratamento destes microrganismos se torna limitado restando como única opção terapêutica a associação de antimicrobianos, como por exemplo, a combinação de polimixina B, colistina e tigeciclina (BRASIL, 2013b).

1.1 *Pseudomonas aeruginosa*: CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS, MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E PANORAMA ATUAL DA RESISTÊNCIA

O microrganismo *P. aeruginosa* é um patógeno GN, oportunista que faz parte do conjunto de bactérias não fermentadoras da glicose. Esta espécie utiliza glicose e outros carboidratos oxidativamente, sendo oxidase positiva rápida, uma propriedade importante para diferenciá-la de alguns membros da família *Enterobacteriaceae* (KONEMAN et al., 2008). Não forma esporos, apresenta motilidade, é reta e brevemente curva, no Gram se apresenta aos pares medindo de 1 a 5 μ m de comprimento e 0,5 a 1 μ m de largura (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2010), como observado na Figura 1.

Figura 1 – *Pseudomonas aeruginosa* visualizada pelo método de coloração de Gram



Fonte: <http://textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html> (acesso 01/03/17).

Quando cultivada, esta espécie pode produzir pigmentos com colorações azuis (piocianina), preta (piomelanina), vermelha (piorrubina) ou verde (pioverdina) como pode ser observado na Figura 2. Esta espécie tem a capacidade de produzir um odor doce semelhante à uva decorrente da produção de trimetilamina (KONEMAN et al., 2008; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2010).

Figura 2 – Crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* em ágar nutriente



Fonte: <http://schaechter.asmblog.org/schaechter/2007/07/pseudomonas-aer.html> (acesso 01/03/2017).

P. aeruginosa é um importante patógeno relacionado a Infecções do Trato Urinário (ITUs) podendo causar infecções crônicas; atinge o sistema respiratório, ocasionando

pneumonias graves, infecções da pele como dermatites e foliculites e infecções dos tecidos moles, oftalmológicas, ósseas, articulares e outras infecções sistêmicas (KONEMAN et al., 2008). Possui a capacidade de formar biofilme, o que torna ainda mais complicado o tratamento de infecções ocasionadas por esse microrganismo, especialmente as que estão associadas aos dispositivos médicos, como cateteres e próteses (RICE, 2006). Por apresentar este fator de virulência esta espécie está cada vez mais associada a bacteremias nosocomiais, infecções relacionadas a dispositivos invasivos e queimaduras em pacientes imunocomprometidos (GILLHAM et al., 2009).

A produção de fatores de virulência de superfície (que permitem a fixação bacteriana, colonização e invasão) e dos fatores de virulência secretados (produção de citocinas) se relacionam ao grau do curso das infecções provocadas por *P. aeruginosa* (KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006). Na prática clínica, é difícil distinguir entre colonização simples da infecção propriamente dita, sendo que, até o momento nenhuma ferramenta de diagnóstico é ideal para avaliar o potencial de virulência em *P. aeruginosa* (MESAROS et al., 2007).

A frequência das taxas de resistência de Bacilos Gram Negativos (BGN) vem crescendo consideravelmente, principalmente em *P. aeruginosa* na América Latina. Informações dos isolados clínicos de centros médicos que compõem o Programa de Vigilância Antimicrobiana SENTRY (hospitais sentinelas do Brasil, Argentina, Chile e México), entre os meses de janeiro de 2008 a dezembro de 2010 evidenciam que dos 1099 isolados de *P. aeruginosa* que compuseram o estudo, as melhores taxas de suscetibilidade aos agentes β -lactâmicos mostradas nesta pesquisa foram: meropenem 57,1% suscetível, imipenem 57,6% suscetível, para ceftazidima e cefepime os isolados foram 61,1 e 61,9% suscetíveis respectivamente (GALES et al., 2012).

Dados internacionais de resistência, como o relatado por Sharma & Srivastava (2016), em um hospital em Jaipur na Índia, apresentam que os isolados de *P. aeruginosa* coletados no período de agosto a dezembro de 2015 foram 18,45% resistentes a amicacina, 31,74% ao ciprofloxacino e 36,50% ao cefoperazona-sulbactam; no entanto, todos os isolados foram 100% suscetíveis ao meropenem e imipenem. Diferenças de padrões de suscetibilidade para os microrganismos entre regiões são comuns, assim o conhecimento dos aspectos epidemiológicos e de resistência dos patógenos auxiliam na adoção da terapia correta adaptada às circunstâncias regionais (MORAES et al., 2014).

1.2 *Acinetobacter* spp.: CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS, MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E PANORAMA ATUAL DA RESISTÊNCIA

Acinetobacter spp. é um patógeno que se apresenta como bacilos cocóides ou cocos GN, é catalase positivo, oxidase negativo, não móvel, aeróbico, não fermentador da glicose e não esporulado (KONEMAN et al., 2008; PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008). É um importante microrganismo a nível nosocomial e se apresenta como colônias opacas, não pigmentadas, com diâmetro de 1,5 a 3 mm (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008) como é ilustrado na Figura 3. *Acinetobacter baumannii* costuma crescer a 42 °C, enquanto as demais espécies desse gênero não crescem nessa temperatura (KONEMAN et al., 2008).

Figura 3 – Crescimento de *Acinetobacter baumannii* em ágar McConkey



Fonte: <http://www.retroscope.eu/wordpress/acinetobacter-2/>(acesso 07/03/2017).

Este microrganismo é considerado ubíquo, possuindo a capacidade de ocupar vários nichos ecológicos no ambiente (ATROUNI et al., 2016). Por apresentar rápida capacidade de transformação e sobreviver a dessecação, além de persistir no ambiente por muito tempo o *Acinetobacter* spp. tem atualmente evidenciado preocupações a comunidade científica principalmente, devido ao seu rápido desenvolvimento de resistência a uma ampla gama de antimicrobianos (DOUGHARI et al., 2011).

O gênero *Acinetobacter* tem a capacidade de colonizar transitoriamente a pele, especialmente as regiões axilares e inguinais, podendo também ser encontrado na cavidade oral e no trato respiratório de adultos hígidos (DIJKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007). Assim, nesta forma, não produz graves problemas sendo então considerado colonizante.

Entretanto, no ambiente hospitalar, ele assume grande importância quando acomete indivíduos imunodeprimidos (FERREIRA et al., 2011).

Entre as manifestações clínicas mais comuns do gênero *Acinetobacter* se destacam: a pneumonia associada a bacteremia, as infecções da pele e tecidos moles e a meningite (GAYNES et al., 2005). A bacteremia é secundária a uma infecção no sistema respiratório e/ou pelos cateteres venosos (FOURNIER; RICHET, 2006). As infecções da pele e tecidos moles pelo *Acinetobacter* spp. atinge geralmente as extremidades dos membros (DAVIS et al., 2005). Os isolados de *Acinetobacter* podem provocar endocardite em próteses valvulares, além de sinusite, peritonite e infecções oculares como a endoftalmite e ceratite (FOURNIER; RICHET, 2006; PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

Acinetobacter spp. é considerado um importante patógeno envolvido em infecções nosocomiais. O crescente isolamento desta espécie MDR tem acarretado inquietações na área científica, como o estudo de Machado e colaboradores (2011) que identificou o mecanismo de resistência de produção de MβLs em 22,4% dos isolados de *Acinetobacter* spp. do Hospital São Vicente de Paula em Passo Fundo, Brasil.

Uma pesquisa prospectiva realizada em dois hospitais de ensino de Teerã, no Irã, identificou 91 isolados de *Acinetobacter* spp. MDRs em Unidades de Tratamento Intensivo (UTI). Estes microrganismos apresentaram taxas de resistência de 59,52% para o imipenem, 77,38% para gentamicina, 96,42% para ciprofloxacina e 52,38% para amicacina e 100% desses isolados foram suscetíveis à colistina e polimixina B (KARMOSTAJ; PEERAYEH; SALMANIAN, 2013).

Diante da alta prevalência de multirresistência em *Acinetobacter* spp. são limitadas as escolhas terapêuticas no tratamento de infecções causada por esta bactéria. Dessa forma, é aconselhável a vigilância regular da resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos neste microrganismo (KARMOSTAJ; PEERAYEH; SALMANIAN, 2013).

1.3 RESISTÊNCIA BACTERIANA

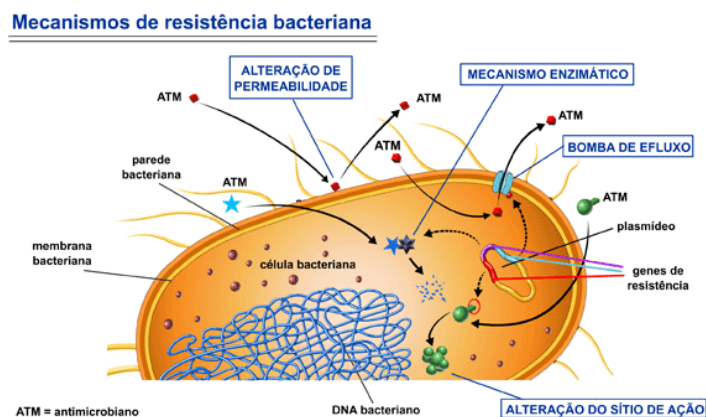
A utilização dos antimicrobianos na terapia clínica foi um marco histórico no desenvolvimento da medicina para cura de doenças que no passado tinham altos índices de mortalidade (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010). No entanto, o uso indiscriminado destes fármacos, contribuiu para o surgimento da resistência bacteriana que representa

atualmente, um sério problema de saúde pública mundial já que as opções terapêuticas para tratar doenças infecciosas, têm se tornado cada vez mais restritas (ROSSI, 2011).

Nos dias atuais, há um crescente aumento das taxas de resistência aos antimicrobianos entre os principais patógenos causadores de Infecções Relacionadas à Assistência de Saúde (IRAS) como é o caso dos GN (*P. aeruginosa*, *A. baumannii* e *K. pneumoniae*) (BOUCHER et al., 2009). O aumento da resistência antimicrobiana implica na necessidade dos programas de vigilância em informar a distribuição das espécies e os padrões de resistência dos patógenos causadores de infecções, assim contribuirá no auxílio aos médicos na escolha da melhor terapia antimicrobiana para os pacientes (PEREIRA et al., 2013).

O conhecimento dos mecanismos bioquímicos e genéticos envolvidos na resistência bacteriana é de grande importância para compreender a forma como a bactéria desenvolve resistência (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010). Apesar de que esses mecanismos diferem entre microrganismos e a resistência está relacionada a alguns fatores básicos como: mutação genética (alteração do sítio alvo); aquisição de genes de resistência (plasmídeos e transposons) e bombas de efluxo que removem o antimicrobiano da célula bacteriana (OPLUSTIL et al., 2010). Na Figura 4 estão apresentados os principais mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos.

Figura 4 – Mecanismos de resistência bacteriana



Fonte: <http://biomedicinaparatos.blogspot.com.br/2015/06/antimicrobianos-so-sobre-prescricao.html/> (acesso 11/05/2017).

As organizações de saúde veem alertando as crescentes taxas de resistência. No ano de 2013, o *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) nos Estados Unidos da América

afirmou que a população mundial está prestes a ingressar na era "pós-antibiótico", em consequência da multirresistência dos microrganismos aos antimicrobianos (CDC, 2013). Em 2014, a Organização Mundial da Saúde (OMS) relatou que a resistência antimicrobiana é uma ameaça de grande preocupação para o governo de quase todos os países (WHO, 2014). Algumas estratégias de controle da resistência exigem esforços para detecção, prevenção e controle da utilização de antimicrobianos, e a adoção de políticas governamentais, conhecimentos científicos gerados na academia e novos medicamentos sintetizados pela indústria. Todos tem a finalidade de conter a disseminação dos patógenos resistentes (ENANI, 2015).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) a fim de atenuar a incidência da resistência bacteriana publicou em 2010 a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 40/2010 que dispõe sobre o controle de medicamentos antimicrobianos. Recentemente em maio de 2011 esta resolução foi revogada pela RDC 20/2011 que traz algumas atualizações e determina que os antimicrobianos vendidos nas farmácias e drogarias ou distribuídos em unidades de saúde do país só poderão ser dispensados aos usuários mediante receita de controle especial (BRASIL, 2010a; BRASIL, 2011). Esta medida busca favorecer não só a redução dos gastos com as internações, mas principalmente a prevenção do surgimento de microrganismos MDRs (ROSSI, 2011).

1.3.1 Resistência aos carbapenêmicos

Os antimicrobianos β -lactâmicos são os principais agentes utilizados para o tratamento de uma variedade de infecções causadas por bactérias GN e GP (POOLE, 2004). Entretanto, a resistência aos β -lactâmicos envolve vários mecanismos, diferenciando para as bactérias GP e GN. Nos microrganismos GP a resistência se dá por mutações e/ou redução da expressão e alterações nas proteínas de ligadoras de penicilina (*Penicillin Binding Proteins*-PBPs) e pela produção de β -lactamases. Por outro lado, nos microrganismos GN, o mecanismo de resistência mais prevalente aos β -lactâmicos, é a produção de β -lactamases, seguido de alterações de permeabilidade, extrusão dos antimicrobianos por bombas de efluxo, e em menor grau, por alterações da PBPs (BECEIRO; TOMÁS, BOU, 2013).

Dentre os mecanismos de resistência aos β -lactâmicos desenvolvidos pelos microrganismos GN, o mecanismo enzimático de resistência aos antibacterianos bastante

relatado é a produção de β -lactamases, que são enzimas capazes de destruir parcial ou totalmente os β -lactâmicos (BUSH, 2001; WALSH et al., 2005; MEYER; PICOLI, 2011).

Segundo Ambler (1980) as β -lactamases estão classificadas de acordo com sua estrutura primária em quatro classes: A, B, C e D, as quais foram agrupadas em serina- β -lactamases (classes A, C e D) e metalo- β -lactamases (M β LS) (classe B), de acordo com diferenças em seus mecanismos catalíticos. As classes A, C e D possuem um resíduo de serina no local ativo da enzima, enquanto as da classe B possuem um resíduo de cisteína e utilizam íons divalentes, usualmente zinco (Zn^{++}) como cofator para a reação de hidrólise do anel β -lactâmico.

Recentemente, Bush; Jacoby (2010) sugeriram uma nova classificação para as β -lactamases que leva em consideração os perfis de substrato e inibidores, agrupando as enzimas com o seu fenótipo em isolados clínicos, desta forma foram classificadas em: - Grupo 1: É o grupo das cefalosporinases do tipo AmpC pertencentes à classe molecular C, de Ambler, que não são inibidas por inibidores de β -lactamases, como o ácido clavulânico e tazobactam; - Grupo 2: São as serino- β -lactamases, enzimas pertencentes ao grupo A e D, de Ambler, representadas pelo maior grupo de β -lactamases. Este grupo é dividido em subgrupos conforme o espectro de ação de cada enzima. Como representantes temos as *Extended-Spectrum β -Lactamase* (ESBL) e *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC); - Grupo 3: São as M β LS que possuem habilidade de hidrolisar carbapenêmicos e são inibidas por quelantes de íons, como o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA).

A resistência aos carbapenêmicos em *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. se deve principalmente pela expressão de M β LS e oxacilinasas (POIREL; NORDMANN, 2006). As M β LS se caracterizam por hidrolisar todos os β -lactâmicos com exceção do monobactâmico aztreonam e necessitam de íons zinco ou outros cátions divalentes como cofatores para a sua atividade catalítica e não são inibidas pelos inibidores de β -lactamases disponíveis comercialmente, apenas por agentes quelantes como o EDTA (BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995; BUSH, 2001). Essas enzimas podem ser codificadas cromossomicamente ou transmitidas por elementos genéticos móveis (WALSH et al., 2005). Desde a identificação da primeira M β L adquirida (móvel), em um isolado de *P. aeruginosa*, no Japão em 1991 (WATANABE et al., 1991), as M β LS têm sido identificadas em isolados clínicos em todo o mundo. Até o presente momento são conhecidas nove subclasses de M β LS adquiridas: IMP (imipenemase) (WATANABE et al., 1991), VIM (Verona imipenemase) (LAURETTI et al., 1999), SPM (São Paulo metalo- β -lactamase) (TOLEMAN et al., 2002), GIM (German imipenemase) (CASTANHEIRA et al., 2004), SIM (Seoul imipenemase) (LEE et al., 2005), AIM (Australian imipenemase) (YONG et al., 2007) e, mais recentemente, KHM (Kyroin

University Hospital metallo- β -lactamase) (SEKIGUCHI et al., 2008), NDM-1 (New Delhi metallo- β -lactamase) (YONG et al., 2009) e DIM-1 (Dutch Imipenemase) (POIREL et al., 2009).

Nos *A. baumannii* as carbapenemases da classe D (oxacilinas (OXA)) têm sido relatadas com frequência, este tipo de enzima é capaz de hidrolisar fracamente o imipenem e meropenem, cefalosporinas de amplo espectro e aztreonam. A atividade é inibida pelo ácido clavulânico, uma propriedade incomum para oxacilinas com exceção da OXA-23, que é resistente ao ácido clavulânico (NORDMANN; POIREL, 2002; BOO; WALSH; CROWLEY, 2006).

A diminuição na suscetibilidade aos carbapenêmicos tem sido observada em diversas partes do mundo inclusive na América Latina. O Programa de Vigilância Antimicrobiana SENTRY (*Antimicrobial Surveillance Program*) nos anos de 2008 – 2010 detectou a presença do gene OXA-23 em espécies de *Acinetobacter* spp. em 26,8% dos isolados provenientes da Argentina e 73,2% dos isolados do Brasil (GALES et al., 2012).

No Brasil, a resistência aos antimicrobianos carbapenêmicos é crescente, sendo relatado com grande frequência em membros da família *Enterobacteriaceae* quanto em Bacilos Gram Negativos Não Fermentadores da glicose (BGN-NF) (ZAVASCKI et al., 2009; ZAVASCKI et al., 2010; BEIRAO et al., 2011; SEKI et al., 2011), esse fato, tornou-se um grave problema clínico e epidemiológico em várias instituições de saúde. Por essa razão, foi elaborada pela ANVISA em 2010 a primeira nota técnica (Nota Técnica Nº1/2010) que normatiza medidas para identificação, prevenção e controle de infecções MDRs. Entre esses microrganismos, destacam-se *P. aeruginosa* e *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos (ertapenem, imipenem e meropenem). Em 2013, esse documento foi reformulado em consequência do aumento significativo dos casos deste tipo de resistência em centros hospitalares brasileiros (BRASIL, 2010b; BRASIL, 2013b).

No momento atual, há descrições mundiais sobre o problema endêmico dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* MDRs associado aos elevados índices de morbi-mortalidade. No Brasil, surtos de infecção ocasionados por *P. aeruginosa* têm sido relacionados com a disseminação clonal principalmente da espécie SPM-1 (NEVES et al., 2011). Essa problemática da resistência aos carbapenêmicos se torna ainda mais preocupante quando as infecções por microrganismos resistentes aos carbapenêmicos atingem indivíduos imunocomprometidos, como o relato de Martins e colaboradores (2012) que descreveram a resistência em *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos (CRAb) em um receptor de pulmão durante um transplante, demonstrando o atual desafio no controle da transmissão de infecções por microrganismos MDRs.

1.3.2 Resistência à colistina

O antimicrobiano colistina (polimixina E) é um polipeptídico catiônico que foi reintroduzido como última linha para o tratamento de bactérias GN MDRs. É amplamente utilizado para o tratamento de infecções gastrointestinais causadas pela família *Enterobacteriaceae* (RHOUMA; BEAUDRY; LETELLIER, 2016). A colistina propriamente dita é comercializada sob forma de pró-fármaco colistimetato de sódio (MARKOU et al., 2008) e apesar de possuir eficiente atividade frente a isolados MDRs, esta substância possui como efeitos colaterais nefrotoxicidade e neurotoxicidade (TRIFI et al., 2015). Os mecanismos de toxicidade renal induzidos por colistina são desconhecidos, mas alguns pesquisadores sugerem que a colistina seja capaz de induzir a permeabilidade da membrana e aumentar a entrada de cátions, ânions e água intracelularmente e resultando na lise celular (TRIFI et al., 2015).

A colistina foi autorizada pela primeira vez no Reino Unido como medicamento de uso veterinário em 2004 e está atualmente autorizada para tratamento profilático de infecções gastrointestinais causadas por *Escherichia coli* em bovinos, ovinos, suínos e aves (TRIFI et al., 2015). No entanto, a resistência à colistina entre animais e seres humanos à este antimicrobiano foi inicialmente relatada por Liu e colaboradores (2016) que sugerem que este mecanismo seja mediado pelo gene *mcr-1*, em *Enterobacteriaceae*, onde há alteração do lipídio A que comumente ancora a molécula de lipopolissacarídeo na membrana externa, resultando em redução da afinidade desta polimixina. No estudo, a prevalência de *mcr-1* foi investigada nas cepas de *E. coli* e *K. pneumoniae* coletadas de dois hospitais terciários e em isolados de carne de suínos e animais na China no período de abril de 2011 e novembro de 2014. Essa pesquisa identificou que a resistência à polimixina E mostrou ser singularmente devida ao gene *mcr-1* mediado por plasmídeo e foi observado o transporte de *mcr-1* em isolados de *E. coli* coletados de 15% das amostras de carne crua e 21% de animais e 1% em amostras de pacientes internados com infecções (LIU et al., 2016).

Du et al. (2016) informaram a co-ocorrência da carbapenemase NDM-5 (responsável pela resistência aos carbapenêmicos) e o gene *mcr-1* (resistência a colistina) em um mesmo isolado clínico de um hospital terciário no leste da China, eles evidenciaram que os isolados co-produtores *mcr-1* e NDM-5 não foram suscetíveis a quase todos os agentes antimicrobianos testados. Este fato é preocupante já que estes isolados produtores de *mcr-1* e

NDM-5 podem se espalhar ainda mais para ambientes hospitalares e em pacientes de alto risco causando infecções incuráveis.

Recentemente, no Brasil, Fernandes e colaboradores (2016) reportaram o primeiro isolado resistente a colistina recuperado de uma *E. coli* em paciente com infecção em pé diabético. Neste estudo, através da análise do genoma completo eles revelaram que o isolado de *E. coli* abrigava o gene *mcr-1* em um plasmídeo IncX4, altamente similar aos plasmídeos IncX4 que possuíam *mcr-1* identificados em *Enterobacteriaceae*, a partir de amostras de alimentos, animais e humanos recuperados em outros continentes. Este achado sugere que os plasmídeos do tipo IncX4 são auto-transmissíveis e podem contribuir para a disseminação intercontinental do gene *mcr-1*.

Lentz et al. (2016), isolaram no Brasil, *E. coli* abrigando gene *mcr-1* em aves não expostas a polimixinas, este autores sugeriram que outros fatores podem estar envolvidos na seleção deste gene. Atualmente, em vista da crescente incidência de resistência antimicrobiana em todo o mundo e a escassez de novos fármacos em desenvolvimento, a resistência mediada pelo gene *mcr-1* representa uma grande ameaça (DOUMITH et al., 2016).

1.4 OPÇÕES DE TRATAMENTO PARA INFECÇÕES POR MICRORGANISMOS MULTIRRESISTENTES

Microrganismos MDRs, principalmente os BGN-NF e enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos, são um grave problema de saúde pública de âmbito mundial particularmente pela elevada mortalidade e pelo reduzido número de opções terapêuticas (POIREL; NORDMANN, 2006; NORDMANN; CORNAGLIA, 2012). As causas do crescimento do número de microrganismos MDRs estão altamente correlacionadas à pressão seletiva devido à utilização dos antimicrobianos (KARAM, 2016). Assim, o crescente aumento da ocorrência de MβLs e oxacilinases em vários microrganismos restringem as opções de tratamento resultando na utilização de combinações de agentes antimicrobianos na tentativa de obter sinergismo entre os fármacos que sozinhos não teriam efeito (WORTHINGTON; MELANDER, 2013).

As polimixinas (B e E ou colistina) ressurgiram como uma opção terapêutica útil, apesar de seus efeitos adversos (nefrotoxicidade, ototoxicidade e bloqueio muscular). Este

grupo de fármacos age na parede celular bacteriana deslocando íons Ca^{2+} e Mg^{2+} que resulta em aumento da permeabilidade na membrana citoplasmática e, conseqüentemente morte celular (FALAGAS; KASIAKOU, 2006). Porém, com o aumento do uso das polimixinas na prática clínica, a emergência da resistência a ela é preocupante (GALES; JONES; SADER, 2006; ZAVASCKI et al., 2007).

Alguns estudos avaliam a utilização de sistemas combinados de terapia para tratamento de cepas MDRs como Gómez-Garcés e colaboradores (2016) que analisaram a atividade *in vitro* de combinações de antimicrobianos e fosfomicina frente a 120 cepas de *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos. Estes autores observaram que a associação fosfomicina/ciprofloxacino apresentou um efeito sinérgico em quase metade dos isolados (40%), enquanto que a associação fosfomicina/amicacina só atingiu este efeito sinérgico em 12% dos casos.

Uma revisão sistemática sobre tratamento antimicrobiano de infecções pela família *Enterobacteriaceae* resistente aos carbapenêmicos relatou que nos estudos onde os pacientes receberam tratamento combinado a mortalidade foi de até 50% para a associação tigeciclina-gentamicina, até 64% para tigeciclina-colistina e 67% para associação carbapenêmico-colistina. Já os estudos em que os pacientes foram tratados com monoterapia, a mortalidade foi de até 57% para a colistina e até 80% para a tigeciclina (FALAGAS et al., 2014).

Atualmente, a orientação terapêutica para o tratamento de isolados MDRs é a politerapia (BRASIL, 2013b) com a utilização de polimixina B ou polimixina E (colistina) em associação com aminoglicosídeos (gentamicina ou amicacina), carbapenêmicos (meropenem ou doripenem) e tigeciclina. Esta última, uma nova droga da classe das glicilciclinas que possui um amplo espectro de ação frente a diversos microrganismos resistentes (BHATTACHARYA; PARAKH; NARANG, 2009).

A inexistência de opções de tratamento adequadas, para a contenção da propagação de patógenos GN resistentes aos carbapenêmicos e MDRs deve ser prosseguido através da implementação de procedimentos para prevenção adequada de infecções e gestão de antimicrobianos. Para assim, reduzir a carga microbiana MDR e evitar futuros surtos desses microrganismos (LEE; DOI, 2014).

1.5 METODOLOGIAS AUTOMATIZADAS E CONVENCIONAIS PARA IDENTIFICAÇÃO DA RESISTÊNCIA EM MICRORGANISMOS

Os sistemas automatizados ou semi-automatizados têm sido amplamente utilizados para identificação de espécies e de testes de suscetibilidade, principalmente em consequência do crescente volume de espécimes clínicos encaminhados para os laboratórios clínicos. A relação custo-eficácia e a interface entre laboratórios e hospitais são algumas das vantagens oferecidas por essas metodologias (SADER et al., 2006).

A identificação bacteriana por métodos convencionais requer 18-24 horas para o isolamento de colônias e pelo menos 24 horas adicionais para identificação de espécies (SANTOS et al., 2013). Dessa forma a adoção de novas tecnologias de diagnósticos surge como uma alternativa para identificar os microrganismos infectantes, principalmente em infecções de corrente sanguínea, onde é perdido tempo esperando o crescimento bacteriano, e neste caso, o emprego de métodos automatizados facilitaria o início rápido da terapia dirigida ao patógeno (PAOLUCCI; LANDINI; SAMBRI, 2010).

Apesar dos métodos automatizados facilitarem o fluxo de trabalho e fornecerem resultados mais rápidos do que métodos convencionais, eles podem ter problemas na identificação e determinação da resistência em alguns patógenos (D'AZEVEDO et al., 2009). Infelizmente erros de reporte de suscetibilidade de microrganismos por qualquer sistema automatizado podem ter sérias implicações para a clínica dos pacientes (SADER et al., 2006).

Variáveis como concentrações do inóculo e tempo de incubação podem afetar na detecção de resistência secundária pela produção de β -lactamases. A rápida suscetibilidade fornecida por sistemas automatizados podem dificultar a detecção da resistência a alguns antimicrobianos β -lactâmicos em consequência dos mecanismos subjacentes de resistência dos microrganismos (SADER et al., 2006).

Alguns estudos se propõem a avaliar metodologias convencionais e automatizadas, como uma pesquisa desenvolvida por Paim e colaboradores (2014) que teve por objetivo avaliar o desempenho de Vitek 2 na identificação de cocos GP e a suscetibilidade à oxacilina e vancomicina. Esta pesquisa evidenciou que este sistema identificou corretamente 77,9% e 97,1% dos isolados em níveis de espécie e gênero, respectivamente.

Moodley e colaboradores (2013) investigaram a suscetibilidade a tobramicina em 39 cepas de *A. baumannii*, isoladas de cinco hospitais da Cidade do Cabo na África do Sul. Esses pesquisadores compararam o Vitek 2, a difusão em disco, o Etest e a diluição em ágar com a

microdiluição em caldo (método de referência) e observaram limitações tanto dos métodos automatizados quanto dos manuais em ensaios de suscetibilidade à tobramicina. Neste estudo, o Vitek 2 apresentou pouca confiabilidade para a detecção da resistência e entre os métodos manuais o Etest foi o mais confiável para testes de suscetibilidade a tobramicina em *A. baumannii*.

O estudo de Markelz e colaboradores (2011) comparou dados de microdiluição em caldo dos antimicrobianos imipenem, meropenem e doripenem de 107 cepas do complexo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus*, isoladas de infecções de sangue e feridas, aos resultados obtidos pela difusão em disco, Etest e métodos automatizados (MicroScan, Phoenix e sistema Vitek 2). Esses autores concluíram que os métodos manuais são mais precisos do que os automatizados e que as taxas de erro para os testes de suscetibilidade para imipenem e meropenem, por difusão em disco e Etest, estavam em uma faixa considerada aceitável.

Conforme aumenta a resistência antimicrobiana, a suscetibilidade concisa para orientar as opções terapêuticas é essencial (MARKELZ et al., 2011). Embora a maioria dos laboratórios de microbiologia clínica dependa fortemente de sistemas automatizados como o principal método de suscetibilidade, a detecção da resistência aos carbapenêmicos nos laboratórios tem sido relatada complexa devido a diversas razões com destaque para a baixa expressão desta resistência, a degradação do fármaco e dificuldades no uso de métodos automatizados para identificação de microrganismos e realização dos testes de suscetibilidade. Falsa resistência e falsa suscetibilidade para o imipenem e meropenem já foram reportados (BABAY et al., 2011; FRANKLIN; LIOLIOS; PELEG, 2006).

Essas dificuldades relatadas podem ser superadas se os laboratórios clínicos adicionassem de forma individual outra metodologia para aqueles microrganismos que mostraram um aumento da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos carbapenêmicos, mas permanecem sensíveis às cefalosporinas (WOODFORD et al., 2010). Atualmente, os sistemas de identificação mais modernos utilizam a espectrometria de massa como o MALDI-TOF. Essa metodologia é baseada em técnicas de ionização e detecção biomolecular que realizam a identificação bacteriana através da análise de perfil de proteínas bacterianas em vez de diferenciação física, bioquímica e metabólica. Essa inovação tecnológica é considerada uma metodologia promissora na microbiologia diagnóstica (SANTOS et al., 2013).

1.6 JUSTIFICATIVA

O Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) é um centro público de saúde com referência regional que oferece atendimento para a região central do estado do Rio Grande do Sul, prestando serviços ambulatoriais e de internação. Este estabelecimento de saúde se propõe a acolher a comunidade para serviços especializados e avançados. Nesse nosocômio nosso grupo de pesquisa já relatou alguns mecanismos de resistência aos antimicrobianos pelos microrganismos *Staphylococcus aureus* (RODRIGUES et al., 2015), *Staphylococcus coagulase negativa* (RIGATTI et al., 2010; RAMPELOTTO et al., 2015), família *Enterobacteriaceae* (SEIBERT et al., 2014) e BGN-NF (MAYER et al., 2012).

Os microrganismos *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. são a temática deste estudo por constituírem os patógenos mais isolados principalmente nas infecções do trato respiratório inferior de pacientes internados nas UTIs no HUSM, assim como em outros nosocômios, nacionais e internacionais (KIRATISIN et al., 2012; SIQUEIRA et al., 2013; SANTOS et al., 2014). Além disso, a sua importância é fortalecida pelo fato de serem os principais agentes etiológicos de infecções hospitalares e por apresentarem resistência a múltiplas classes de antimicrobianos, e até pan-resistência, isto é, resistência a todos os antimicrobianos comercialmente disponíveis.

Sabe-se que é de extrema importância pesquisar localmente a resistência nestes isolados clínicos, assim, o presente trabalho busca investigar o perfil de resistência aos antimicrobianos e aos carbapenêmicos das cepas de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. de 2011/2012 e 2015/2016 do HUSM, avaliar metodologias convencionais e automatizadas para identificação da resistência ao meropenem nos isolados de 2011/2012 e identificar a resistência bacteriana à colistina em *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. isolados em 2015/2016. Dessa forma, acredita-se que será possível traçar a epidemiologia local destes BGN-NF, minimizar as taxas de morbidade e mortalidade; cercar a resistência bacteriana e reduzir os custos hospitalares, além de obter inferências sobre metodologias para detecção da resistência aos carbapenêmicos.

1.7 OBJETIVOS

1.7.1 Objetivo geral

Investigar a resistência bacteriana em isolados de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. coletados em dois períodos (2011/2012 e 2015/2016); avaliar metodologias para identificação da resistência ao meropenem nos isolados de 2011/2012 e identificar a resistência à colistina nos isolados de 2015/2016 provenientes de um hospital universitário no sul do Brasil.

1.7.2 Objetivos específicos

- Comparar a resistência aos antimicrobianos em isolados clínicos de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. entre os anos de 2011/2012 e 2015/2016;
- Determinar a resistência aos carbapenêmicos nos isolados clínicos de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. dos anos de 2011/2012 e 2015/2016 e identificar a faixa etária, os espécimes clínicos e as unidades hospitalares onde foi mais prevalente este tipo de resistência;
- Determinar a sensibilidade, especificidade e acurácia das metodologias de difusão do disco (manual), MicroScan[®]-SIEMENS e VITEK[®]2-bioMérieux (automatizadas) quando, comparados ao método de microdiluição em caldo (considerado padrão de referência) para a identificação da resistência ao meropenem nos isolados clínicos de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. do período de agosto de 2011 a janeiro de 2012;
- Avaliar a concordância das metodologias de difusão do disco, MicroScan[®]-SIEMENS e VITEK[®]2-bioMérieux em relação a metodologia de microdiluição em caldo através do índice Kappa.
- Avaliar a resistência à colistina nos BGN-NF isolados no período de agosto de 2015 a janeiro de 2016;
- Determinar o perfil de suscetibilidade dos isolados que apresentarem resistência à colistina.

2 PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

2.1 Artigo 1 - Letter to the Editor: Colistin resistance in non-fermenting Gram - negative bacilli in a university hospital

2.2 Manuscrito 1 - Assessment of resistance to carbapenems in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. isolated in a tertiary hospital

2.3 Manuscrito 2 - Avaliação de metodologias para identificação da resistência ao meropenem em *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp.

2.1 Artigo 1

Letter to the Editor: Colistin resistance in non-fermenting Gram - negative bacilli in a university hospital ¹

Silvana Oliveira dos Santos¹, Sthefanine Martins La Rocca², Rosmari Hörner³

¹ Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Maria, RS, BR

² Curso de Farmácia da Universidade Federal de Santa Maria, RS, BR

³ Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal de Santa Maria, RS, BR

Autora corresponde:

Rosmari Hörner: Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) – Centro de Ciências da Saúde (CCS) – Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas – DACT- Avenida Roraima, número 1000 – Prédio 26 – salas 1201/1205 – Fone: 55 3220 8751/ 55 9111 9691- FAX: 55 3220 1880 – CEP: 97105-900

¹ Artigo publicado *The Brazilian Journal Infectious Diseases*, v.20, n. 6, p. 649-650, 2016 (ANEXO B)

Dear Editor,

Indiscriminate use of antimicrobials has caused the worldwide emergence of multidrug resistant bacteria (MDR). Glucose non-fermenting gram-negative bacilli (NF-GNB) that show resistance to several antimicrobials, including colistin, have been reported, being the highest rates of this type of resistance registered in Asia and Europe [1]. This fact has created problems in therapy, since the referred antibiotic is used as the last alternative to treat infections caused by MDR bacteria [2]. *Pseudomonas aeruginosa* is a skilful microorganism that causes severe opportunistic infections in immunocompromised patients due to its metabolic versatility [3]. Isolation of *P. aeruginosa* is increasing in Intensive Care Units (ICU), and it is resistant to almost all available antimicrobials, thus being responsible for the increase in the number of Healthcare-Associated Infections (HAI), significantly influencing morbidity, mortality, and high costs of treatment of infected patients [1].

In a prospective study developed between August, 2015 and January, 2016 we isolated 293 NF-GNB of various clinical specimens from patients admitted to a university hospital in the central region of Rio Grande do Sul, Brazil. Identification and antimicrobials sensitivity test were performed through the automated system VITEK[®]2 (bioMérieux). Data were interpreted according to the document M100-S25 of the *Clinical and Laboratory Standards Institute* [CLSI, 2015], being considered resistant the isolated specimens which showed intermediate and/or colistin resistant profiles.

From the 293 NF-GNB assessed in this study, only two genera were identified, being 78.83% (231) *P. aeruginosa* and 21.16% (62) *Acinetobacter* spp.. Colistin resistance was identified in nine isolated strains of *P. aeruginosa* (9/231-3.89%) and none in *Acinetobacter* spp.. The predominant age group of patients in whom colistin-resistant strains were identified was 41-69 years old (77.77%), and they also showed expressive resistance to carbapenems (66.67%) (Table 1).

Table 1 - Sensitivity profile of 9 *P. aeruginosa* isolates resistant to colistin

Antimicrobial	Sensitive (n-%)	Resistant (n-%)
Amikacin	7-77.78%	2-22.23%
Gentamicin	5-55.56%	4-44.45%
Cefepima	5-55.56%	4-44.45%
Ciprofloxacin	4-44.45%	5-55.56%
Piperacillin-Tazobactam	3-33.34%	5-55.56%
Ampicillin-Sulbactam	0	9-100%
Imipenem	3-33.34%	6-66.67%
Meropenem	3-33.34%	6-66.67%
Ceftazidime	3-33.34%	6-66.67%

The clinical specimens of this nosocomial in which predominated the isolation of colistin-resistant *P. aeruginosa* were secretions of soft tissues (3/9-33.33%) and respiratory secretions (sputum and tracheal secretion - 2/9-22.22%). The hospital units in which resistant strains were initially identified were medical clinic (2/9-22.23%), surgery clinic (2/9-22.23%), recovery room (2/9-22.23%), nephrology area, adult ER, and ICU (1/9-11.11% each).

From the nine patients in whom colistin-resistant *P. aeruginosa* was isolated, three progressed to death due to septicemia, four were oncologic patients under antineoplastic and radiotherapy regimens, a post kidney transplant patient, two diabetes mellitus patients, and two chronic smokers/alcoholics. Therefore, we ratify that patients' immunodepression make them vulnerable to infections caused by colistin-resistant microorganisms.

The extensive use of colistin in veterinary medicine to treat gastrointestinal infections caused by *Enterobacteriaceae* has contributed to chromosomal mutations mediated by the plasmid *mcr-1* to codify resistance to colistin in gram-negative bacilli. Fernandes and colleagues report the evidence of *mcr-1* originated from *Escherichia coli* isolated from food of animal origin in Brazil since 2012 [4]. This silent dissemination of *E. coli* mediated by this plasmid is impacting for ICUs in our country, where the emergence and dissemination of MDR bacteria associated with high rates of treatment failure has stimulated the use of poliximins that constitute the main therapeutic option for the treatment of infections by "superbug", especially *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* producer of SPM-1, OXA-23 or KPC-2 [5]. Additional studies are being developed by our research group to identify the gene *mcr-1* in isolated strains that show resistance to colistin.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

1. CAI Y, CHAI D, WANG R, LIANG B, BAI N. Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. J Antimicrob Chemother. 2012; 22: 1-9.
2. OLAITAN AO, MORAND S, ROLAIN JM. Emergence of colistin-resistant bacteria in humans without colistin usage: a new worry and cause for vigilance. Int J Antimicrob Agents. 2016; 47: 1-3.
3. GELLATLY SL, HANCOCK REW. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. Pathog Dis. 2013; 67: 159-173.

4. FERNANDES MR, MOURA Q, SARTORI L, et al. Silent dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contribute to the global spread of the *mcr-1* gene. *Euro Surveill.* 2016; 21 (17):1-6.
5. ROSSI F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. *Clin Infect Dis.* 2011; 52 (9): 1138-43.

2.2 Manuscrito 1

Assessment of resistance to carbapenems in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. isolated in a tertiary hospital ¹

Silvana Oliveira dos Santos¹; Rosmari Hörner^{2*}; Mônica de Abreu Rodrigues¹; Angelita Bottega¹; Danielly da Costa Silva¹; Roberta Filipini Rampelotto¹.

¹*Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Department of Clinical and Toxicological Analysis, Health Sciences Center, Federal University of Santa Maria,*
²*Department of Clinical and Toxicological Analysis, Health Sciences Center, Federal University of Santa Maria*

***Correspondence:**

R. Hörner

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas – DACT

Centro de Ciências da Saúde (CCS)

Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

Avenida Roraima, número 1000 – Prédio 26 – salas 1201/1205

CEP: 97105-900 - Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil

Fone: 55 3220 8751/ 55 99111 9691-

FAX: 55 3220 1880.

Email: rosmari.ufsm@gmail.com

¹ Manuscrito submetido ao periódico *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* (ANEXO C)

Abstract

Pseudomonas aeruginosa and *Acinetobacter* spp. are amongst the main agents associated to nosocomial infections. Nowadays, there is a progressive increase of multidrug resistant microorganisms (MDR), limiting treatment alternatives. Colistin has been used as the last alternative possible to treat MDR bacteria. This study aims to assess resistance to carbapenems of *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. isolated from clinical specimens at a university hospital. Sixty-three isolates of *P. aeruginosa* and 39 of *Acinetobacter* spp. were collected between August/2011 and January/2012, and 231 isolates of *P. aeruginosa* and 62 of *Acinetobacter* spp. were collected between August/2015 and January/2016. The susceptibility test to antimicrobials was performed with the automated system VITEK[®]2-bioMérieux. A decrease in resistance to imipenem and meropenem from 64.10% to 53.24% was observed in *P. aeruginosa* isolates in 2011/2012 and 2015/2016. A decrease was also observed in isolates of *Acinetobacter* spp. from 88.57% to 74.19% in the same period. The observed susceptibility of these bacteria to colistin was approximately 80% in the analyzed periods. Dissemination of resistance to carbapenems is a world issue and choosing an effective antibiotic therapy is a challenge for clinicians.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*. *Acinetobacter* spp.. Carbapenems.

Running Title: Resistance to carbapenems in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp.

Introduction

Pseudomonas aeruginosa and *Acinetobacter* spp. are amongst the main agents associated to nosocomial infections and are responsible for the increasing rates of morbidity and mortality in patients in critical conditions worldwide (Baumgart, Molinari, Silveira, 2010; Barros, Bento, Caetano, *et al.*, 2012; Afifi, Suelam, Soliman *et al.*, 2013; Siqueira, Cardoso, Pádua *et al.*, 2013; Omer, Gumaa, Hassan *et al.*, 2015). In present days, the progressive increase of bacteria isolation with multidrug resistance patterns is an ascending and worrying issue due to the limited availability of effective antimicrobial agents, together with the small number of clinical assays in progress (Gales, Castanheira, Jones *et al.*, 2012).

The increase of resistance to cephalosporins in hospital environments, especially of *P. aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*, has its roots in the intense use of carbapenems (Baumgart, Molinari, Silveira, 2010). Nevertheless, the use of this class of drugs is threatened by the increase of incidence of resistant microorganisms (Araujo, Ferreira, Campos *et al.*, 2016).

Resistance to multiple classes of antimicrobials is a challenge for the treatment of immunocompromised patients. Gram-negative bacteria are the most prone to develop resistance mechanisms, especially against β -lactams. Amongst the most representative mechanisms we can enumerate their destruction due to the production of β -lactamases; impermeability due to the loss of porin in bacterial cell walls (the main resistance mechanism to carbapenems for *P. aeruginosa*); and expulsion via efflux pumps (what may lead to resistance to multiple classes of these agents) (Karam *et al.*, 2016).

Surveillance studies aid in monitoring the use of antimicrobials and choosing the effective empirical therapy (WHO, 2001). This study aimed to assess resistance to carbapenems in clinical isolates of *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. in 2011/2012 and 2015/2016 at a university hospital.

Materials and methods

Sixty-three isolates of *P. aeruginosa* and 39 of *Acinetobacter* spp. were collected between August/2011 and January/2012, being identified through phenotypic tests as well as the automated methodology MicroScan[®] (Siemens) at the Laboratório de Análises Clínicas (LAC) of Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM). In order to assess the changes in the susceptibility profile of isolates in this hospital, new isolates were collected between August/2015 and January/2016, being 231 isolates of *P. aeruginosa* and 62 *Acinetobacter* spp. identified and assessed through the automated method VITEK[®]2 (bioMérieux).

These isolates were sent to the Bacteriology Laboratory at Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), where they were cultured in *Tryptic Soy Agar* (TSA) and incubated in $35 \pm 2^\circ\text{C}$ from 18 to 24 hours. Colonies were stored in *Tryptic Soy Broth* (TSB) with glycerol 15% at -80°C for subsequent test performance. It is important to note that only one non-consecutive sample per patient was included in this study.

Testing of susceptibility of strains to antimicrobials was performed with the automated system VITEK[®]2-bioMérieux according to the manufacturer's recommendation, and assessed according to the document M100-S25 of the *Clinical and Laboratory Standards Institute*

(CLSI, 2015). For the assessment of resistance to carbapenems the microorganisms considered resistant were the ones that showed intermediate and/or resistant profile to at least one of the carbapenem antimicrobials tested (imipenem, meropenem).

The study has been submitted to and approved by the Research Ethics Committee (CEP) of Universidade Federal de Santa Maria and is registered under the CAAE n. 38850614.4.0000.5346.

Results

This study has evidenced the increase of 3.66 times of *P. aeruginosa* isolates in this hospital, being 63 isolates found in 2011/2012 compared to 231 in 2015/2016. Regarding samples of *Acinetobacter* spp., 39 were isolated in 2011/2012 and 62 in 2015/2016, what corresponds to an increase of 1.58 times.

From the samples collected in 2011/2012, it was possible to recover and perform the assessment of susceptibility profile in only 39 isolates of *P. aeruginosa* (39/63) and 35 isolates of *Acinetobacter* spp. (35/39). In the subsequent period, all strains collected were tested.

Through the analysis of the resistance profile of isolates from 2011/2012 and 2015/2016 (**Table I** and **Table II**), it is possible to observe that both *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. showed lower resistance rates to colistin. Moreover, it was found that *Acinetobacter* spp. isolates from 2015/2016 showed increased susceptibility to most antimicrobials tested. However, the most expressive increase in susceptibility rates can be observed for amikacin (from 14.28% to 80.64%). *P. aeruginosa*, on the other hand, showed decrease in susceptibility to ciprofloxacin and gentamicin, and a slight increase in susceptibility to piperacillin/tazobactam between 2011/2012 and 2015/2016.

Table I – Resistance profile of *P. aeruginosa* (n= 39) and *Acinetobacter* spp. (n=35) isolates in 2011/2012 according to the automated system VITEK 2®

Antimicrobial Agent	Microorganism					
	<i>P. aeruginosa</i> (n = 39)			<i>Acinetobacter</i> spp. (n = 35)		
	S (%)	R(%)	NT (%)	S (%)	R (%)	NT (%)
Amikacin	27(69.24)	12(30.76)	0(0.00)	5(14.28)	30(87.71)	0(0.00)
Ampicillin/sulbactam	1(2.56)	34(87.18)	4(10.26)	4(11.43)	29(82.85)	2(5.72)
Cefepima	21(53.85)	18(46.15)	0(0.00)	2(5.71)	33(94.29)	0(0.00)
Ceftazidime	15(38.46)	18(46.15)	6(15.38)	2(5.71)	2(5.71)	31(88.57)
Ciprofloxacin	23(58.98)	16(41.02)	0(0.00)	2(5.71)	33(94.29)	0(0.00)
Colistin	31(79.48)	3(7.70)	5(12.89)	31(88.57)	1(2.86)	3(8.57)
Gentamicin	26(66.66)	13(33.34)	0(0.00)	1(2.86)	34(97.14)	0(0.00)
Imipenem	11(28.21)	22(33.34)	6(15.38)	5(14.29)	27(77.14)	3(8.57)
Meropenem	15(38.46)	24(61.54)	0(0.00)	4(11.43)	31(88.57)	0(0.00)
Piperacillin/tazobactam	12(30.77)	27(69.23)	0(0.00)	NT	NT	35(100.00)
Sulfamethoxazole/trimethopim	0(0.00)	5(12.82)	32(87.18)	0(0.00)	2(5.71)	33(94.29)

S = sensitive; R = resistant; NT = not tested

Table II – Resistance profile of *P. aeruginosa* (n = 231) and *Acinetobacter* spp. (n = 62) isolates in 2015/2016 according to the automated system VITEK 2®

Antimicrobial Agent	Microorganism					
	<i>P. aeruginosa</i> (n = 231)			<i>Acinetobacter</i> spp. (n = 62)		
	S (%)	R (%)	NT (%)	S (%)	R (%)	NT (%)
Amikacin	166(71.86)	65(28.13)	0(0.00)	50(80.64)	12(19.35)	0(0.00)
Ampicillin/sulbactam	0(0.00)	180(77.92)	51(22.07)	21(33.87)	34(54.83)	7(11.29)
Cefepima	121(52.38)	110(47.61)	0(0.00)	12(19.35)	50(80.64)	0(0.00)
Ceftazidime	99 (42.85)	76 (32.90)	56(24.24)	9 (14.51)	46(74.19)	7(11.29)
Ciprofloxacin	114(49.35)	117(50.64)	0(0.00)	12(19.35)	50(80.64)	0(0.00)
Colistin	165(71.42)	9(3.89)	57(24.67)	55(88.70)	0(0.00)	7(11.29)
Gentamicin	123(53.24)	108(46.75)	0(0.00)	33(53.22)	29(46.77)	0(0.00)
Imipenem	87(37.66)	91(39.39)	53(22.94)	14(22.58)	41(66.12)	7(11.29)
Meropenem	110(47.61)	118(51.08)	3(1.29)	16(25.80)	46(74.19)	0(0.00)
Piperacillin/tazobactam	93(40.25)	135(58.44)	3(1.29)	0(0.00)	1(1.61)	61(98.38)
Sulfamethoxazole/trimethopim	0(0.00)	52(22.51)	179(77.48)	2(3.22)	5(8.06)	55(88.70)

S = sensitive; R = resistant; NT = not tested

In the assessment of resistance to carbapenems (intermediate/resistant profile to at least one carbapenem) of *P. aeruginosa* isolates a decrease was observed in a proportion of 1.20 times between 2011/2012 (25/39 – 64.10%) and 2015/2016 (123/231 – 53.24%). The decrease rate was similar for *Acinetobacter* spp. (1.19 times), being 31/35 (88.57%) in 2011/2012, and 46/62 (74.19%) in 2015/2016.

The highest isolation of carbapenem-resistant bacteria in both periods occurred in male patients, being *P. aeruginosa* (56.00%) and *Acinetobacter* spp. (61.31%) in 2011/2012, and *P. aeruginosa* (65.85%) and *Acinetobacter* spp. (80.43%) in 2015/2016.

In **Table III** we show the age group of patients with isolates of *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. resistant to carbapenems.

Table III – Age group of patients with isolates of *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. resistant to carbapenems

Age group	Microorganism			
	<i>P. aeruginosa</i>		<i>Acinetobacter</i> spp.	
	2011/2012 (n=25)	2015/2016 (n=123)	2011/2012 (n=31)	2015/2016 (n=46)
≤ 10 years old	3/25- (12.00%)	4/123-(3.25%)	0-(0.00%)	0-(0.00%)
11-40 years old	5/25-(20.00%)	15/123-(12.19%)	5/31-(16.13%)	16/46-(34.78%)
41-69 years old	9/25-(36.00%)	80/123-(65.04%)	21/31-(67.75%)	23/46-(50.00%)
≥70 years old	8/25-(32.00%)	24/123-(19.51%)	5/31-(16.13%)	7/46-(15.21%)

Table IV references the clinical specimens from which carbapenem-resistant *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. were recovered.

Table IV – Clinical specimens of *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. isolates resistant to carbapenems

Clinical specimens	Microorganism			
	<i>P. aeruginosa</i>		<i>Acinetobacter</i> spp.	
	2011/2012 (n=25)	2015/2016 (n=123)	2011/2012 (n=31)	2015/2016 (n= 46)
Faeces	1/25-(4.00%)	1/123-(0.81%)	0-(0.00%)	0-(0.00%)
Blood	3/25-(12.00%)	13/123-(10.56%)	1/31- (3.23%)	2/46-(4.34%)
Secretions (bile; surgical wound; eschar; catheter)	6/25-(24.00%)	38/123-(30.89%)	7/31-(22.58%)	24/46-(52.17%)
Respiratory secretions (sputum; tracheal secretion)	12/25-(48.00%)	37/123-(30.08%)	21/31-(67.75%)	17/46- (36.95%)
Urine	3/25-(12.00%)	34/123-(27.64%)	2/31-(6.45%)	3/46-(6.52%)

The distribution of carbapenem-resistant isolates from this study in hospital units may be verified in **Table V**.

Table V – Hospital unit of *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. isolates resistant to carbapenems

Unit	Microorganism			
	<i>P. aeruginosa</i>		<i>Acinetobacter</i> spp.	
	2011/2012 (n=25)	2015/2016 (n=123)	2011/2012 (n=31)	2015/2016 (n=46)
Adult ICU*	5/25-(20.00%)	35/123-(28.45%)	19/31-(61.30%)	7/46-(15.21%)
PA-Adult**	4/25-(16.00%)	21/123-(17.07%)	2/31-(6.45%)	2/46-(4.34%)
5° Floor (Medical Clinic II)	4/25-(16.00%)	24/123-(19.51%)	5/31-(16.13%)	7/46-(15.21%)
UCI-RN e Ped.***	2/25-(8.00%)	2/123-(1.62%)	0-(0.00%)	0-(0.00%)
3° Floor (Surgical Clinic)	4/25-(16.00%)	12/123-(9.75%)	3/31-(9.68%)	3/46-(6.52%)
Surgical ward e Recovery room	5/25-(20.00%)	6/123-(4.87%)	0-(0.00%)	9/46-(19.56%)
Ambulatory	1/25-(4.00%)	14/123-(11.38%)	0-(0.00%)	6/46-(13.04%)
Nephrology	0-(0.00%)	6/123-(4.87%)	1/31-(3.22%)	5/46-(10.86%)
4° Floor (Medical Clinic I)	0-(0.00%)	1/123-(0.81%)	1/31-(3.22%)	1/46-(2.17%)
2° Floor (Gynecology)	0-(0.00%)	1/123-(0.81%)	0-(0.00%)	0-(0.00%)
CTCriac ⁺	0-(0.00%)	0-(0.00%)	0-(0.00%)	7/46-(15.21%)
SID ⁺⁺	0-(0.00%)	0-(0.00%)	0-(0.00%)	2/46-(4.34%)

Adult ICU* = Adult Intensive Care Unit; PA-Adult** = Adult Emergency Room; UCI-RN e Ped.*** = Pediatric and Neonatal Intensive Care Unit; CTCriac⁺ = Infant Cancer Treatment Center; SID⁺⁺ = Home Care Service

Discussion

In present days, there is a growing number of isolates of Gram-negative microorganisms such as *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. resistant to antimicrobials, and they are a challenge for the treatment of infections related to health care (Laxminarayan, Duse, Wattal *et al.*, 2013). Knowing the resistance of microorganisms to antimicrobials in hospital infections is a fundamental factor since changes in the susceptibility profile have made it difficult to perform treatment (Ghadiri, Vaez, Khosravi *et al.*, 2012). Carbapenems are important in clinical practice mainly in what refers to treatment of acute hospital infections related to Gram-negative microorganisms. Nevertheless, despite this promising activity, there are reports of increase in resistance to this class of antimicrobials (Baumgart, Molinari, Silveira, 2010; Gales, Castanheira, Jones *et al.*, 2012).

This study was the first one developed in this tertiary hospital aiming to assess the increase/decrease of resistance to carbapenems in different periods in *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* spp.. A decrease in resistance to carbapenems was detected in the studied periods, except for *P. aeruginosa* isolates collected in 2015/2016, in which a slight increase of resistance to imipenem was observed (**Table II**). A study that assessed the evolution of resistance to these antimicrobials in *A. baumannii* between 1995 and 2012 in a clinic from

north of Taiwan, China, found that susceptibility to carbapenems decreased at a constant pace throughout the studied period, going from 88.1% (2001 and 2003) to <25% (2010 and 2012), whereas isolates remained susceptible to colistin (nearly 100%) and tigecycline (80%) (Wei Ku, Kung, Lee *et al.*, 2015).

Ali, Mumtaz, Naz, *et al.* (2015) observed that colistin and meropenem were the most efficient antimicrobials against *P. aeruginosa* in different hospitals in Karachi, Pakistan, between July/2012 and June/2013. The isolates showed susceptibility rates of 100% and 85.8%, respectively, differently from *P. aeruginosa* isolates of this study, with susceptibility to colistin and meropenem lower than 80% and 50%, respectively, in the two periods studied.

Among the factors that contributed to the decrease in resistance to carbapenems of approximately 1.2 times in the study in 2011/2012 and 2015/2016 in this hospital, it is possible to highlight the role of the Hospital Infection Control Committee (CCIH). This committee has been working on the qualification of professionals which work at the hospital as well as on the rigorous dispensation of antimicrobials.

Male patients were the most prevalent with isolates resistant to carbapenems for the two microorganisms studied in the analyzed periods. The prevalence of multidrug resistant *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. in Intensive Care Units (ICUs) was investigated in a study in the National Liver Institute in Egypt and evidenced that from 160 patients who participated in the research, 97 (66.62%) were men, and 63 (39.37%) were women (Ghoneim, Awad, Khalil, 2010). The same was observed in a university hospital in north-west Paraná, Brazil in which 62.7% of *P. aeruginosa* and 59.6% of *Acinetobacter* spp. were isolated in male patients (Siqueira, Cardoso, Pádua *et al.*, 2013).

Resistance to carbapenems in the studied isolates in both periods (2011/2012 and 2015/2016) has predominated in the age group 41-69 years old (**Table III**), corroborating the study by Kim and colleagues (2012) carried out in a tertiary hospital in Korea, in which the epidemiology of carbapenem-resistant isolates of *A. baumannii* was investigated, and the average age group was 58.3 ± 23.9 . Mayr, Yende, Angus (2014) suggest that most incidence of infections by microorganisms occurs in elder patients, who are more vulnerable to comorbidities such as diabetes and lung diseases, besides the aging process which leads to the decline of physiological activities, and alterations in organs and systems.

Colistin is the antimicrobial of choice for most infections caused by multidrug resistant microorganisms, such as *Acinetobacter* spp., *P. aeruginosa* and the *Enterobacteriaceae* family (Trifi, Abdellatif, Daly *et al.*, 2016). Nevertheless, recent reports have shown resistance to colistin in Europe and Asia, resulting from nosocomial transmission

of the gene *mcr-1*, making its monitoring during therapy a challenge for medical teams that intend to avoid the dissemination of these resistant strains (Liu, Wang, Walsh *et al.*, 2015; Doumith, Godbole, Ashton *et al.*, 2016). A study developed by our study group has reported nine (3.89%) *P. aeruginosa* isolates resistant to colistin in this hospital between August/2015 and January/2016 (Santos, La Rocca, Hörner, 2016). It has recently become a recommendable measure by a government surveillance agency of a given country that bacteriology laboratories which assess susceptibility to polymyxins by broth microdilution should immediately inform CCIH in case they detect strains of *Escherichia coli* with Minimum Inhibitory Concentration (MIC) CIM \geq 4 mg/L (Brasil, 2016).

The present study has evidenced a significant decrease in rates of resistance to amikacin by *Acinetobacter* spp. from 87.51% in 2011/2012 to 19.35% in 2015/2016. Data lower than of a study developed in an ICU of a tertiary hospital in Bangladesh, where it was observed that 68.4% of *Acinetobacter* spp. isolates of tracheal aspirate were resistant to amikacin (Nahar, Yende, Angus *et al.*, 2012).

This study has shown that in 2015/2016 there was an increase of *P. aeruginosa* isolates in urine cultures (27.64%). It is also important to highlight that in 2015/2016 there was a decrease of this microorganism resistant to carbapenems in peripheral blood (10.56%) (**Table IV**). A research developed in India in the first six months of 2015 found 19.23% carbapenem-resistant isolates of *P. aeruginosa* in urine cultures and 15.38% in blood (Banjare, Barapatre, 2015).

Isolation of carbapenem-resistant microorganisms in this study predominated in the Adult ICU (**Table V**), corroborating the rates observed by Siqueira and colleagues (2013) who found 41.4% of *P. aeruginosa* isolates in ICUs at a hospital in Paraná. ICUs are particularly the most prone to infections by multidrug resistant microorganisms, which are easily disseminated in medical devices, such as tubes and catheters (Syndnor, Perl *et al.*, 2011). Bacteremias, infections of the respiratory airways and of post-operative wounds are frequently caused by *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. especially in ICUs, where these microorganisms are opportunistic and affect almost exclusively patients submitted to invasive procedures (Hinrichsen, Falcão, Vilella *et al.*, 2014).

Also important to note is the onset of isolation of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. in the period 2015/2016 in the CTCriac (15.21%) (**Table V**), the unit which assists patients with weakened immune system who are undergoing chemotherapy. Infections caused by *A. baumannii* in people undergoing hematopoietic stem cell therapy manifest through bacteremias and show poor prognosis due to the acute underlying disease called hematologic

neoplasia, long-term use of broad spectrum antimicrobials, and invasive instrumentation, such as central venous catheters ou endotracheal intubation (Al-Anazi, Al-Jasser, 2014).

Understanding and continuously monitoring susceptibility and resistance to carbapenems in *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. isolates allow us to develop strategies, such as the ones developed by CCIH in the referred university hospital. Results of this study revealed that there was a considerable decrease of isolates of *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. resistant to carbapenems as well as other antimicrobials. Studies such as this have great importance since microorganisms such as *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. of patients either colonized or infected consist of a world challenge for public health in terms of morbidity, mortality, as well as costs for the health system in our country.

Acknowledgements

We would like to thank the team at Laboratorio de Análises Clínicas at HUSM for allowing us to develop this study and to the Programa de Incentivo à Iniciação Científica of HUSM (PROIC-HUSM) for the financial support.

References

Afifi MM, Suelam IIA, Soliman MTA, El-Gohary MGS. Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Environmental and Clinical Samples in Upper Egypt. *Inter J Biol Chem*. 2013;7(2):47-57.

Al-Anazi KA, Al-Jasser, AM. Infections caused by *Acinetobacter baumannii* in recipients of hematopoietic stem cell transplantation. *Front. in Oncology*. 2014;(4)1-10.

Ali Z, Mumtaz N, Naz, SA, Jabeen N, Shafique M. Multi-Drug Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: A threat of nosocomial infections in tertiary care hospitals. *J Pak. Med. Assoc*. 2015;65(1):12-16.

Araujo BF, Ferreira ML, Campos, PA, Royer S, Batistão, DWF, Dantas RCC, et al. Clinical and Molecular Epidemiology of Multidrug- Resistant *P. aeruginosa* Carrying *aac(6')-Ib-cr*, *qnrS1* and *bla_{SPM}* Genes in Brazil. *PLoS ONE*. 2016;11(5):1-15.

Banjare B, Barapatre R. Incidence of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in clinical samples. *Int. J. of Biomed. Res.* 2015;6(8):567-569.

Barros LM, Bento JNC, Caetano JA, Moreira RAN, Pereira FGF, Frota NM, Araújo TM, Soares E. Prevalência de microrganismo e sensibilidade antimicrobiana de infecções hospitalares em unidade de terapia intensiva de hospital público no Brasil. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* 2012;33(3):429-435.

Baumgart AMK, Molinari MA, Silveira ACO. Prevalence of carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in high complexity hospital. *Braz. J Infect. Dis.* 2010;14(5):433-436.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Comunicado de Risco Nº 01/2016 – GVIMS/GGTES/ANVISA.** Detecção do gene responsável pela resistência à polimixina mediada por plasmídeos (*mcr-1*) no Brasil. 06 de outubro de 2016. Disponível em: <http://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/alertas/item/comunicado-de-risco-01-2016> (acesso 26/10/2016).

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, twenty-fifth informational supplement, document M100-S25.* Wayne, PA, USA: CLSI, 2015.

Doumith M, Godbole G, Ashton P, Larkin L, Dallman T, Day M *et al.* Detection of the plasmid-mediated *mcr-1* gene conferring colistin resistance in human and food isolates of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* in England and Wales. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(8):2300-2305.

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) *Diag. Microbiol. and Infec. Dis.* 2012;(73):354-360.

Ghadiri H, Vaez H, Khosravi S, Soleymani E. The Antibiotic Resistance Profiles of Bacterial Strains Isolated from Patients with Hospital-Acquired Bloodstream and Urinary Tract Infections. *Crit. Care Res. and Pract.* 2012;(2012):1-6.

Ghoneim E, Awad S, Khalil M. Prevalence of Multi-Drug Resistant *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. causing nosocomial infection in Intensive Care Unit (ICU) of National Liver Institute. *Egyp. J of Med Microbiol.* 2010;19(1):107-118.

Hinrichsen SL, Falcão E, Vilella TAS, Lira C, Junior BJS, Cruz PWS. Occurrence of *Acinetobacter* in two private tertiary hospitals in Northeastern Brazil. *Rev. Panam. Infectol.* 2014;16(3):174-179.

Karam G, Chastre J, Wilcox MH, Louis Vincent J. Antibiotic strategies in the era of multidrug Resistance. *Critical Care.* 2016;20(136):1-9.

Kim IJ, Kim SI, Kim YR, Hong KW, Wie SH, Park YJ, Jeong H, Kang MW. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: diversity of resistant mechanisms and risk factors for infection. *Epidemiol. Infect.* 2012;(140):137–145.

Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi AKM, Wertheim HFL, Sumpradit N. *et al.* Antibiotic resistance- the need for global solutions. *The Lancet Infectious Diseases.* 2013;12(12):1057-1098.

Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J. *et al.* Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis.* 2015;(16):161-168.

Mayr FB, Yende S, Angus DC. Epidemiology of severe sepsis. *Virulence.* 2014;5(1):4-11.

Nahar A, Anwar S, Saleh AA, Miah MRA. Isolation of *Acinetobacter* species and their antimicrobial resistance pattern in an Intensive care unit (ICU) of a tertiary care hospital in Dhaka, Bangladesh. *Bangla. J Med. Microbiol.* 2012;6(1):3-6.

Omer MI, Gumaa SA, Hassan AA, Idris KH, Ali OA, Osman MM *et al.* Prevalence and Resistance Profile of *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates from a Private Hospital in Khartoum, Sudan. *Am. J. of Microbiol. Res.* 2015;3(2):76-79.

Santos SO, La Rocca SM, Hörner R. Colistin resistance in non-fermenting Gram-negative bacilli in a university hospital. *Braz J Infect Dis.* 2016;20(6):649-50.

Siqueira VLD, Cardoso RF, Pádua RAF, Caleffi-Ferracioli KR, Helbel C, Santos AC *et al.* High genetic diversity among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. isolated in a public hospital in Brazil. *Braz J of Pharm. Scien.* 2013;49(1):49-56.

Sydnor ERM, Perl TM. Hospital Epidemiology and Infection Control in Acute-Care Settings. *Clinical Microbiology Reviews.* 2011;24(1):141-173.

Trifi A, Abdellatif S, Daly F, Mahjoub K, Nasri R, Oueslati M *et al.* Efficacy and Toxicity of High-Dose Colistin in Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacilli Infections: A Comparative Study of a Matched Series. *Chemoterapy.* 2016;(61):190-196.

Wei Ku W, Kung CH, Lee CH, Tseng CP, Wu PF, Kuo SC *et al.* Evolution of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: An 18-year longitudinal study from a medical center in northern Taiwan. *J. of Microbiol. Immu. and Infec.* 2015;(48):57-64.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Global. Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance, 2001. 105 p.

2.3 Manuscrito 2

Avaliação de metodologias para identificação da resistência ao meropenem em *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp.¹

Silvana Oliveira dos Santos¹; Mônica de Abreu Rodrigues¹, Angelita Bottega¹, Fernanda Aguirre Carvalho¹, Rosmari Hörner²

¹ Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Maria, RS, BR

² Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal de Santa Maria, RS, BR

Autora corresponde:

Rosmari Hörner: Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) – Centro de Ciências da Saúde (CCS) – Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas – DACT- Avenida Roraima, número 1000 – Prédio 26 – salas 1201/1205 – Fone: 55 3220 8751/ 55 99111 9691- FAX: 55 3220 1880 – CEP: 97105-900

¹ Manuscrito será submetido para publicação no periódico *Journal of Clinical Laboratory Analysis*

Avaliação de metodologias para identificação da resistência ao meropenem em *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp.

Silvana Oliveira dos Santos¹; Mônica de Abreu Rodrigues¹, Angelita Bottega¹, Fernanda Aguirre Carvalho¹, Rosmari Hörner²

¹ Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Maria, RS, BR

² Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal de Santa Maria, RS, BR

Autora corresponde:

Rosmari Hörner: Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) – Centro de Ciências da Saúde (CCS) – Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas – DACT- Avenida Roraima, número 1000 – Prédio 26 – salas 1201/1205 – Fone: 55 3220 8751/ 55 99111 9691- FAX: 55 3220 1880 – CEP: 97105-900

Resumo

Contextualização: *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. multirresistentes constituem importantes patógenos envolvidos em infecções nosocomiais graves. Atualmente o crescente aporte de espécimes clínicos encaminhados aos laboratórios de bacteriologia para cultura necessitam da otimização que oferecem os sistemas automatizados na identificação da suscetibilidade aos antimicrobianos. **Métodos:** Microdiluição em caldo (MC - quantitativo), difusão do disco (DD - qualitativo) e os sistemas automatizados MicroScan[®]-SIEMENS e VITEK[®]2-bioMérieux (semi-quantitativos) foram os métodos utilizados na detecção da resistência ao meropenem em *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. isolados em hospital do sul do Brasil. **Resultados:** Um total de 102 amostras selecionadas, armazenadas em glicerol 15%, e destas, 52 recuperadas foram submetidas à análise da resistência ao meropenem. Considerando a MC padrão ouro, a DD apresentou 91% de sensibilidade, 77% de especificidade, 86% de acurácia, demonstrando boa concordância com o método padrão (Kappa = 0.688); o MicroScan[®]- SIEMENS evidenciou, 100%, 77% e 92%, respectivamente, e melhor concordância (Kappa = 0.820); os resultados do VITEK[®]2-bioMérieux foram 97%, 55%, 82% e a concordância com o método padrão foi regular (Kappa = 0.577), a mais baixa entre os três analisados. **Conclusão:** Devido a resistência a múltiplos antimicrobianos e envolvimento frequente em infecções hospitalares, aliado aos desfechos desfavoráveis destes dois microrganismos, torna-se fundamental a detecção correta do perfil de suscetibilidade aos carbapenêmicos. Os resultados obtidos neste estudo sugerem a utilização do método de disco difusão e o sistema MicroScan[®]- SIEMENS na detecção deste importante perfil de suscetibilidade.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*; *Acinetobacter* spp.; metodologias; resistência bacteriana; carbapenêmicos; meropenem.

Abstract

Background: Multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. are important pathogens involved in serious nosocomial infections. Currently the increasing contribution of clinical specimens sent to bacteriology laboratories for culture requires the optimization of automated systems in the identification of antimicrobial susceptibility. **Methods:** Broth microdilution (BD - quantitative), disk diffusion (DD - qualitative) and the automated systems MicroScan® - SIEMENS and VITEK® 2 - bioMérieux (semi - quantitative) were the methods used in the detection of resistance to meropenem in *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. isolated in a hospital in southern Brazil. **Results:** A total of 102 samples selected, stored in glycerol 15%, and of these, 52 were subjected to meropenem resistance analysis. Considering the BD gold standard, the DD presented 91% sensitivity, 77% specificity, 86% accuracy, showing good agreement with the standard method (Kappa= 0.688); The MicroScan®-SIEMENS showed, 100%, 77% and 92%, respectively, and better agreement (Kappa= 0.820); the results of VITEK®2-bioMérieux were 97%, 55%, 82% and agreement with the standard method was regular (Kappa= 0.577), the lowest among the three analyzed. **Conclusion:** Due to the resistance to multiple antimicrobials and frequent involvement in hospital infections, together with the unfavorable outcomes of these two microorganisms, the correct detection of the profile of the susceptibility to carbapenems is essential. The results obtained in this study suggest the use of the disk diffusion method and the MicroScan®-SIEMENS system in the detection of this important susceptibility profile.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*; *Acinetobacter* spp.; methodology; bacterial resistance; carbapenems; meropenem.

Introdução

Na atualidade, é crescente o isolamento de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. resistentes a múltiplos antimicrobianos (MDRs). Estes microrganismos têm ocasionado grandes preocupações aos pesquisadores e profissionais da saúde, pois são frequentes patógenos envolvidos em infecções nosocomiais graves com opções terapêuticas limitadas, representando um desafio para o controle das infecções no âmbito hospitalar (MARKELZ et al., 2011, MATHLOUTHI et al., 2015, GARNACHO-MONTERO et al., 2016). A detecção precisa da resistência aos carbapenêmicos merece atenção especial. Já que estes antimicrobianos são a última opção de tratamento de infecções graves causadas por bacilos Gram negativos com resistência a múltiplos fármacos (SHAIN, 2015).

Os laboratórios clínicos em sua rotina diária, conforme vai aumentando os números de culturas bacteriológicas enviadas, vão se tornando mais adeptos aos sistemas automatizados, devido a sua otimização na liberação dos testes de suscetibilidade aos antimicrobianos

(BABAY et al., 2009). Estes sistemas, além da maior rapidez na emissão dos laudos, pois estes aparelhos possuem sistemas de detecção óptica capazes de medir alterações discretas do crescimento bacteriano, permitem a redução do trabalho manual e proporcionam a emissão de relatórios que podem ser enviados a diferentes setores hospitalares (BAMFORD et al., 2010).

Embora existam benefícios na utilização de sistemas automatizados em microbiologia, elevadas taxas de erros na identificação da resistência aos carbapenêmicos têm sido relatados (MARKELZ et al., 2011; GAUTAM et al., 2013; LEE et al., 2013). A detecção laboratorial da resistência a essa classe de fármacos tem sido descrita como sendo difícil em função da baixa expressão deste mecanismo, degradação do fármaco, erros de identificação do mecanismo de resistência e de teste de suscetibilidade por métodos automatizados, além da ausência de métodos padronizados de detecção (BABAY et al., 2009).

Neste estudo, foram avaliados a microdiluição em caldo (MC - quantitativo), difusão do disco (DD – qualitativo) e os sistemas automatizados MicroScan[®]-SIEMENS e VITEK[®]2-bioMérieux (semi-quantitativos) na detecção da resistência ao meropenem de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. isolados em um hospital terciário da região sul do Brasil.

Materiais e métodos

Isolados clínicos

Durante os meses de agosto de 2011 a janeiro de 2012, 63 amostras de *P. aeruginosa* e 39 de *Acinetobacter* spp. foram isoladas de vários espécimes clínicos de pacientes admitidos no Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), Rio Grande do Sul, Brasil. Posteriormente, estes isolados foram encaminhados ao Laboratório de Bacteriologia da Universidade Federal de Santa Maria (LABAC - UFSM) e repicados em *Tryptic Soy Agar* (HiMedia[®], Laboratórios, Índia), incubados em estufa bacteriológica a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 18-24 h e armazenadas em glicerol 15% em freezer -80°C . Do total de amostras da coleção foi possível recuperar 19 *P. aeruginosa* e 33 *Acinetobacter* spp. que foram submetidas as quatro metodologias para a identificação da resistência ao carbapenêmico meropenem: metodologias convencionais (difusão do disco e microdiluição em caldo) e metodologias automatizadas (MicroScan[®] (SIEMENS, Alemanha) e VITEK[®]2 (bioMérieux, França)).

Difusão do disco

Para a metodologia de difusão do disco, um inóculo bacteriano equivalente à escala 0,5 de McFarland foi semeado com o auxílio de um *swab* em placa com ágar *Mueller Hinton*

(HiMedia[®], Laboratories, Índia), no qual foi dispensado um disco de meropenem (10 µg, DME - Diagnósticos Microbiológicos Especializados, Brasil). Após incubação em estufa bacteriológica a 35±2°C (16-18 h para *P. aeruginosa* e 20-24 h para *Acinetobacter* spp.) o halo de inibição de crescimento foi medido e interpretado conforme orientações do *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI) (CLSI, 2016).

Microdiluição em caldo

A microdiluição em caldo empregou uma placa de 96 poços onde se dispensou 100µL de caldo *Mueller Hinton* (HiMedia[®], Laboratories, Índia), seguida da adição em cada poço de 100µL do inóculo bacteriano de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. equivalente à escala 0,5 de McFarland, sendo adicionado em conjunto, concentrações crescentes (256 a 0.25µg/mL) do antimicrobiano meropenem (ABL Antibióticos do Brasil, Brasil). Passado o período de incubação de 16-24 horas a 35 ± 2°C, foi realizada a leitura visual da Concentração Inibitória Mínima (CIM) conforme recomendações do CLSI. A CIM realizada por microdiluição de caldo para meropenem e a difusão em disco foram de acordo com os critérios do CLSI e se utilizaram cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 como controle de qualidade (CLSI, 2016).

Suscetibilidade em sistema automatizado MicroScan[®]-SIEMENS e VITEK[®]2-bioMérieux

A suscetibilidade em sistema automatizado MicroScan[®]-SIEMENS e VITEK[®]2-bioMérieux foi realizada utilizando cartões de identificação e suscetibilidade conforme os procedimentos técnicos do fabricante do aparelho, contido no Procedimento Operacional Padrão (POP) do Laboratório de Análises Clínicas do HUSM.

Análise dos dados

Para avaliação das metodologias para identificar a resistência ao meropenem foi calculada a sensibilidade, especificidade e acurácia dos métodos, considerando a técnica de microdiluição em caldo (CIM) do antimicrobiano meropenem como o padrão de referência. Bem como, o valor preditivo positivo e negativo de cada método. Na análise da concordância entre as metodologias foi utilizado o teste de concordância índice Kappa através da fórmula e interpretação proposta por Landis & Koch (1977).

Aspectos éticos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria sob o número de registro 38850614.4.0000.5346.

Resultados e discussão

P. aeruginosa e *Acinetobacter* spp. são frequentemente relatados como os principais agentes patogênicos isolados em infecções de pacientes hospitalizados (DAS et al., 2016). No presente estudo, dos 52 isolados submetidos às quatro metodologias avaliadas, 19 eram *P. aeruginosa* (19/52-36.5%) e 33 *Acinetobacter* spp. (33/52-60.6%). Dados de uma pesquisa realizada na Unidade de Tratamento Intensivo (UTI) de um hospital público de Fortaleza, Ceará, demonstraram que *P. aeruginosa* foi responsável por 33.8% e *Acinetobacter* sp. por 12.6% das infecções diagnosticadas (BARROS et al., 2012). A maior parte dos isolados de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. da presente pesquisa foi isolada de pacientes do gênero masculino (52.6% e 60.6% respectivamente). Corroborando com um estudo transversal, que investigou a resistência aos carbapenêmicos em *Acinetobacter* spp. e *P. aeruginosa* em um hospital terciário brasileiro em Juiz de Fora, Minas Gerais, onde a prevalência no gênero masculino foi de 52.3% nos isolados de *Acinetobacter* spp. e 28.5% de *P. aeruginosa* (DIAS et al., 2016).

Avaliando a faixa etária dos pacientes, dos quais foram isolados os microrganismos deste estudo, foi observado que *P. aeruginosa* prevaleceu em indivíduos com idade ≥ 70 anos (36.8%) e os isolados de *Acinetobacter* spp. na faixa etária de 41-69 anos (72.7%). Dados que se assemelham com a média de idade encontrada de 49.9 anos para *Acinetobacter baumannii* e 59.0 anos para *P. aeruginosa*, em um estudo que investigou as características epidemiológicas de pacientes com ventilação mecânica na UTI do hospital universitário de Uberlândia, Minas Gerais (ROYER et al., 2015).

No presente estudo, *P. aeruginosa* foi recuperada principalmente de diferentes secreções (biliar, ferida operatória, escaras) correspondendo a 42.1%, enquanto que *Acinetobacter* spp. na sua maioria foi isolado de secreções respiratórias (escarro e secreção traqueal), 63.6%. Resultados semelhantes a uma pesquisa realizada em dois hospitais do Líbano (Tripoli e Benghazi), a qual identificou que 47.8% dos isolados de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* provieram de secreções de feridas e 25.1% de secreções traqueais (MATHLOUTHI et al., 2015).

A unidade hospitalar na qual *P. aeruginosa* teve maior isolamento foi o centro cirúrgico (bloco cirúrgico e sala de recuperação) que contabilizaram juntas 21.0%. Ao passo que *Acinetobacter* spp. prevaleceu na UTI-Adulto (57.6%). Hildalgo et al. (2011) em seu estudo realizado em um hospital do Peru, observou que 6.8% das infecções hospitalares ocorreram nas clínicas cirúrgicas e 26.8% em UTIs.

A avaliação do desempenho dos métodos testados em relação ao método considerado padrão (microdiluição em caldo) para identificação da resistência ao meropenem se encontra na Tabela 1.

Tabela 1 - Desempenho das metodologias testadas para identificação da resistência ao meropenem em isolados de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. considerando a MC como padrão ouro

Metodologia testada	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Acurácia (%)
Difusão do disco	91	77	86
MicroScan [®] -SIEMENS	100	77	92
VITEK [®] 2-bioMérieux	97	55	82

MC = microdiluição em caldo

A sensibilidade para difusão do disco na presente pesquisa é superior à encontrada por um estudo desenvolvido por Lee & Chung (2015), que avaliou a suscetibilidade ao ertapenem na família *Enterobacteriaceae* por diferentes métodos e considerou a microdiluição em caldo como padrão de referência. Os autores encontraram 50% de sensibilidade e 98,1% de especificidade para difusão do disco e com o MicroScan as taxas foram de 65% e 84,6%, respectivamente.

Em um estudo que avaliou a habilidade de três sistemas automatizados (BD Phoenix, VITEK[®]2-bioMérieux, e MicroScan[®]-SIEMENS), em inferir a produção de carbapenemase em enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos e caracterizadas genotipicamente, demonstrou 85% de sensibilidade e 6% de especificidade para o MicroScan NM36 e 74% e 38%, respectivamente para VITEK[®]2-bioMérieux (WOODFORD et al., 2010).

O Valor Preditivo Negativo (VPN) no presente estudo, para a difusão do disco, foi de 82% e o Valor Preditivo Positivo (VPP) foi de 88%, já para o MicroScan[®]-SIEMENS, 100% e 89%, respectivamente e o VITEK[®]2-bioMérieux apresentou VPN = 90% e VPP = 80%. Estes achados se assemelham a investigação desenvolvida por Jean e colaboradores (2015) em um hospital universitário de Taiwan que também estudou em bactérias do grupo de Bacilos Gram Negativos Não Fermentadores (BGN-NF) e comparou o método da diluição em ágar com dois sistemas automatizados (BD Phoenix e VITEK[®]2-bioMérieux) e a difusão do

disco para avaliar a suscetibilidade do antimicrobiano cefoperazone-sulbactam (cefalosporina de terceira geração + inibidor de betalactamase). Eles observaram que para os isolados de *P. aeruginosa* o VPN foi de 100% e VPP de 86,4%, para difusão do disco e VPN= 98,9% e VPP= 90% para Vitek 2.

Os erros maiores e menores e o índice Kappa dos três métodos testados em nosso estudo, para identificar a resistência ao meropenem frente à metodologia padrão, estão listados na Tabela 2.

Tabela 2 - Tipos de erros produzidos e índice Kappa para cada metodologia testada para avaliar a resistência ao meropenem em isolados de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. considerando a MC como padrão ouro

Metodologia testada	Erro Maior (%)	Erro Menor (%)	Kappa
Difusão do disco	8.82	22.22	K= 0.688
MicroScan [®] -SIEMENS	0	22.22	K= 0.820
VITEK [®] 2-bioMérieux	2.94	44.44	K= 0.577

MC = microdiluição em caldo

Foram considerados erros maiores quando na metodologia padrão o microrganismo era resistente e no método teste ou em análise era sensível. Enquanto que, para o erro menor o microrganismo era sensível no padrão e resistente no teste.

Kulah e colaboradores (2009) em uma pesquisa na qual investigou a resistência ao imipenem em *Acinetobacter baumannii* por sistemas automatizados: BD Phoenix, VITEK[®]2-bioMérieux, e MicroScan[®]-SIEMENS; e convencionais: difusão de disco, Etest[®] e microdiluição em caldo (método de referência). Esta demonstraram que o Etest[®] apresentou o melhor desempenho com 1.8% de erros menores, VITEK[®]2-bioMérieux produziu 7.2% de erros menores, o BD Phoenix produziu 2.8% de erros maiores e a difusão do disco produziu 1.8% de erros muito maiores. Além disso, o MicroScan[®]-SIEMENS mostrou o pior desempenho em testes de suscetibilidade com taxas de 25% de erro muito maiores e 44.6% de erros menores, diferentemente da encontrada em nosso estudo.

Uma pesquisa desenvolvida por Sapino e colaboradores (2012), comparou o Etest[®] com a difusão do disco e dois sistemas automatizados (Sensititre e Vitek 2). Esses autores observaram que a difusão do disco não mostrou erros muito grandes na determinação da suscetibilidade de alguns antimicrobianos betalactâmicos em *P. aeruginosa*.

Um estudo avaliou a precisão da detecção da resistência aos carbapenêmicos em isolados de *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. e *Enterobacteriaceae*, utilizando o método da difusão do disco como referência. Este evidenciou 1.94% de erros maiores e 13.6% de erros

menores na suscetibilidade ao meropenem em isolados de *Acinetobacter* spp. pelo sistema automatizado MicroScan (BABAY et al., 2009).

No presente estudo, o índice Kappa em relação à difusão do disco teve uma boa concordância (0.688) com o método padrão (MC) e a concordância foi maior (0.820) para o sistema automatizado MicroScan[®]-SIEMENS (ótima concordância). Para o VITEK[®]2-bioMérieux foi regular (0.577). Na Turquia, uma pesquisa que comparou o sistema automatizado VITEK[®]2-bioMérieux e a microdiluição em caldo do antimicrobiano meropenem para *P. aeruginosa* encontrou Kappa= 0.938, evidenciando que houve ótima concordância entre esses dois métodos, divergente ao nosso estudo, que foi regular (ACUNER et al., 2011). Em sua pesquisa Kulah e colaboradores (2009) encontraram K= 0.158 para o sistema automatizado MicroScan, enquanto que para difusão do disco, o Kappa foi de K= 0.870, quando utilizaram a MC como método de referência para detectar a resistência ao imipenem em *Acinetobacter baumannii*, resultado este, semelhante ao encontrado no presente estudo.

Diferentes estudos sugerem que os laboratórios clínicos devam utilizar sistemas adicionais de detecção da suscetibilidade antimicrobiana em conjunto com sistemas automáticos em virtude dos erros fornecidos por essas metodologias. Discordâncias de suscetibilidade podem trazer sérias implicações para a clínica dos pacientes, como por exemplo, falha terapêutica de certos antimicrobianos (JURETSCHKO et al., 2007; KULAH et al., 2009; ARDEBILI et al., 2016).

A resistência aos carbapenêmicos é atualmente uma preocupação mundial. Em vista disso, é fundamental que a resistência a essa classe de antimicrobianos seja detectada de forma confiável nos laboratórios clínicos. Nesse estudo a difusão do disco e o sistema MicroScan[®]-SIEMENS apresentaram os melhores desempenhos na avaliação da resistência ao meropenem comparadas ao método padrão (microdiluição em caldo). Estes dois métodos foram os que apresentaram melhor especificidade e acurácia, bem como os melhores índices de concordância. Dados estes que são essenciais quando analisamos uma nova metodologia para ser adicionada em um laboratório clínico.

Agradecimentos

Nós agradecemos à equipe do Laboratório de Análises Clínicas do HUSM, por possibilitar a execução desta pesquisa e ao Programa de Incentivo à Iniciação Científica do HUSM (PROIC-HUSM) pelo apoio financeiro.

Referências

- Acuner I C, Bayramoğlu G, Birinci A, Çekiç Cihan Ç, Bek Y, Durupinar B. Performance Evaluation of VITEK 2 System in Meropenem Susceptibility Testing of Clinical *Pseudomonas aeruginosa* Isolates. Mikrobiyol Bul 2011; 45:411-421.
- Ardebili A, Talebi M, Lari A R. Comparison of disk diffusion and E-Test with the reference method of microbroth dilution for susceptibility testing of *Acinetobacter baumannii* isolates to tetracyclines. Medical Labor J 2016, 10: 44-49.
- Babay H A H, Path K, Manneh K, Somily A M. Accuracy of detecting resistance to carbapenems among Gram negative rods: comparison of three methods. J T U Med Sc 2009, 4:53-61.
- Bamford C, Goodway J, Hoffmann, R. Rapid identification and susceptibility testing of Gram-negative bacilli from blood cultures using the Vitek® 2 system. South Afr J Epidemiol Infect 2010, 25:28-31.
- Barros L M, Bento J N C, Caetano J A, et al. Prevalência de micro-organismo e sensibilidade antimicrobiana de infecções hospitalares em unidade de terapia intensiva de hospital público no Brasil. Rev Ciênc Farm Básica Apl 2012, 33: 429-435.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-six informational supplement, document M100-S26. Wayne, PA, USA: CLSI 2016.
- Das N K, Grover N, Sriram R, Kumar M, Dudhat V L, Prasanna S. Prevalence of carbapenem resistance and comparison between different phenotypic methods for detection of metallo-β-lactamases in Gram negative non-fermentative bacteria in the acute wards of a tertiary care centre. Int J Curr Microbiol App Sci 2016, 5:109-119.
- Dias V C, Diniz C G, Peter A C O, et al. Epidemiological characteristics and antimicrobial susceptibility among carbapenem-resistant non-fermenting bacteria in Brazil. J Infect Dev Ctries 2016, 10: 544-553.
- Garnacho-Montero J, Gutiérrez-Pizarra A, Díaz-Martín A, et al. *Acinetobacter baumannii* in critically ill patients: molecular epidemiology, clinical features and predictors of mortality. Enferm Infecc Microbiol Clin 2016, 34:551-558.
- Gautam V, Singhal L, Arora S, Jha C, Ray P. Reliability of Kirby-Bauer disk diffusion method for detecting carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* Complex isolates. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2013, 57:2003-2004.
- Hidalgo L F, Marroquín J E, Antogni J, Samalvides F. Prevalencia de infecciones hospitalarias en un hospital peruano de nivel IV, en el año 2008. Rev Med Hered 2011; 22:76-81.
- Jean S, Liao C, Sheng W, Lee W, Hsueh P. Comparison of commonly used antimicrobial susceptibility testing methods for evaluating susceptibilities of clinical isolates of

Enterobacteriaceae and nonfermentative Gram-negative bacilli to cefoperazone sulbactam. J Microbiol, Immunol and Infection 2015, xx:1-10 (*article in press*).

Juretschko S, et al. Accuracies of β -Lactam Susceptibility Test Results for *Pseudomonas aeruginosa* with Four Automated Systems (BD Phoenix, MicroScan WalkAway, Vitek, and Vitek 2). J Clin Microbiol 2007; 45:1339-1342.

Kulah C, Aktas E, Comert F, Ozlu N, Akyar I, Ankarali H. Detecting imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* by automated systems (BD Phoenix, Microscan WalkAway, Vitek 2); high error rates with Microscan WalkAway. BMC Infec Dis 2009; 9:1-7.

Landis J R, Koch G G. The measurement of observe agreement or categorical data. Biometrics 1977, 33:159-174.

Lee M, Chung H. Different antimicrobial susceptibility testing methods to detect ertapenem resistance in enterobacteriaceae: VITEK2, MicroScan, Etest, disk diffusion, and broth microdilution. J Microbiol Methods 2015, 112:87-91.

Lee S Y, Shin J H, Lee K, et al. Comparison of the Vitek 2, MicroScan, and Etest methods with the agar dilution method in assessing colistin susceptibility of bloodstream isolates of *Acinetobacter* Species from a Korean university Hospital. J Clinical Microbiol 2013, 51:1921-1926.

Markelz A E, Mende K, Murray C K, et al. Carbapenem susceptibility testing errors using three automated systems, disk diffusion, Etest, and broth microdilution and carbapenem resistance genes in isolates of *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* Complex. Antimicrob Agents Chemother 2011, 55:4707-4711.

Mathlouthi N, Areig Z, Bayssari C A, et al. Emergence of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* clinical isolates collected from some Libyan hospitals. Microbial Drug Resist 2015, 21: 335-341.

Royer S, Faria A L S, Seki L M, et al. 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 2015, 19:350-357.

Sapino B, Mazzucato S, Solinas M, Gion M, Grandesso S. Comparison of different methods for determining beta-lactam susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa*. New Microbiol 2012, 35:491-494.

Shain K, Tekin A, Ozdas S, et al. Evaluation of carbapenem resistance using phenotypic and genotypic techniques in *Enterobacteriaceae* isolates. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2015, 14:1-6.

Woodford N, Eastaway A T, Ford, M, et al. Comparison of BD Phoenix, Vitek 2, and MicroScan Automated Systems for Detection and Inference of Mechanisms Responsible for Carbapenem Resistance in *Enterobacteriaceae*. J Clin Microbiol 2010, 48:2999-3002.

3 DISCUSSÃO

Nos dias atuais, o acelerado surgimento de microrganismos resistentes aos antimicrobianos em todo o mundo está relacionado a 90% das mortes por infecções por bactérias MDRs (AL-JUDAIBI, 2014; VENTOLA, 2015). Muitos dos avanços no desenvolvimento de medicamentos antimicrobianos resultaram de esforços para combater mecanismos de resistência em constante evolução. No entanto, certos antimicrobianos tornaram-se ineficientes, exigindo da comunidade científica a busca de novas moléculas mais eficazes, ou até mesmo, foi necessário retomar a utilização de certos antimicrobianos mais antigos, como é o caso da colistina (polimixina E) (KANJ; KANAFANI, 2011).

O antimicrobiano colistina na atualidade é considerado como a última opção terapêutica no tratamento de infecções causadas por patógenos GN MDRs (OLAITAN; MORAND; ROLAIN, 2016). Contudo, há relatos do surgimento da resistência de GN à colistina em isolados de pacientes que haviam ou não, anteriormente, recebido este antimicrobiano na terapia e também através da aquisição do gene de resistência por transmissão nosocomial (BOGDANOVICH et al., 2011; OLAITAN et al., 2014).

No presente estudo, (**Artigo 1**) dos 293 BGN-NF avaliados 231 (78,83%) eram *P. aeruginosa* e 62 (21,16%) eram *Acinetobacter* spp.. A resistência à colistina foi evidenciada em nove isolados de *P. aeruginosa* (9/231-3,89%) e em nenhum *Acinetobacter* spp.. Este percentual pode ser considerado elevado e preocupante quando comparado ao encontrado em um estudo desenvolvido em um hospital Universitário no Irã, que encontrou apenas dois isolados de *P. aeruginosa* resistentes à colistina (2/100- 2%) (GOLI et al., 2016). Recentemente, a resistência à colistina mediada por plasmídeos está sendo relatada em vários países como o Reino Unido e China, sendo atribuída à rápida transmissão nosocomial do gene *mcr-1*. Assim, torna-se necessário monitorar o uso deste fármaco durante a terapia e reforçar as práticas de controle das infecções hospitalares, a fim de evitar a disseminação dos clones resistentes (LIU et al., 2016; DOUMITH et al., 2016).

Os isolados que apresentaram a resistência à colistina (**Artigo 1**) mostraram-se também expressivamente resistentes aos carbapenêmicos imipenem e meropenem (66.67%). Este perfil pode ter influenciado na evolução clínica dos pacientes, pois identificamos que dos nove pacientes em que *P. aeruginosa* foi resistente à colistina, três progrediram a óbito em consequência de choque séptico. Capone e colaboradores (2013), em uma pesquisa realizada

em nove hospitais de Roma (Itália), encontraram uma taxa de 40,6% de mortalidade em pacientes infectados por *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos e à colistina.

Em outubro de 2016, a ANVISA publicou um comunicado de risco nº 01/2016 sobre a detecção do gene responsável pela resistência à polimixina mediada por plasmídeos (*mcr-1*) no Brasil. Este documento traz medidas a serem adotadas pelos laboratórios de microbiologia onde as Comissões de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) devem ser informadas quando da detecção de cepas de *E. coli* com CIM \geq 4mg/L para polimixina. Salienta-se, que a detecção destas cepas devem ser notificadas por meio do formulário da ANVISA (Notificação de Agregado de Casos e Surto em Serviços de Saúde) e, posteriormente, estes isolados devem ser encaminhados ao Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN) do estado para realização de testes de confirmação. Adicionalmente, os estabelecimentos de saúde devem adotar medidas de controle do uso das polimixinas (BRASIL, 2016).

O comunicado de risco nº 01/2016 reforça a informação de que a única metodologia laboratorial aceitável para a avaliação da suscetibilidade às polimixinas é a microdiluição em caldo e que alguns isolados carreadores do gene *mcr-1* podem apresentar CIM $<$ 2mg/L para as polimixinas. Este comunicado sugere que o método padrão ouro para a detecção desse gene é a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) (BRASIL, 2016). Por esse motivo, nosso grupo está em fase de adaptação da metodologia de PCR para a confirmação da resistência a colistina nestes nove isolados de *P. aeruginosa* (**Artigo 1**).

A disseminação de microrganismos resistentes, principalmente em UTI, ameaça a adequada cobertura antimicrobiana de pacientes infectados nos serviços de saúde. Karam e colaboradores (2016) destacam que este problema tem origem multifatorial, mas que a emergência da resistência aos antimicrobianos está altamente correlacionada com a pressão seletiva resultante de uso destes fármacos. Desta forma, nosso grupo de pesquisa se propôs a avaliar a resistência aos carbapenêmicos (principal escolha para tratamento de BGNs MDRs) em *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp., entre os anos de 2011/2012 e 2015/2016, no HUSM (**Manuscrito 1**). Observou-se que ocorreu um aumento de 3,66 vezes no isolamento de *P. aeruginosa* e de 1,58 vezes para *Acinetobacter* spp.. Uma pesquisa em um hospital universitário na China, que investigou a resistência aos carbapenêmicos em culturas de sangue entre os anos de 2004-2011, identificou também o aumento de quase três vezes nas taxas de isolamento de *K. pneumoniae* e *A. baumannii* (ZHANG et al., 2014).

Considerando os perfis de resistência apresentados pelos isolados em estudo (**Manuscrito 1**), observou-se que tanto *P. aeruginosa* quanto *Acinetobacter* spp.

apresentaram menores taxas de resistência frente ao antimicrobiano colistina, e que os isolados de 2015/2016 de *Acinetobacter* spp. aumentaram a suscetibilidade frente a maioria dos antimicrobianos testados, sendo mais expressivo à amicacina (14,28% para 80,64%). Já a *P. aeruginosa* demonstrou diminuição das taxas de suscetibilidade frente à ciprofloxacino e gentamicina e discreto aumento à piperacilina/tazobactam de 2011/2012 para 2015/2016. Neste contexto, podemos assegurar que os isolados de 2015/2016 expressaram-se menos resistentes a grande parte dos antimicrobianos testados. Este fato é ratificado com uma redução da resistência aos carbapenêmicos (perfil intermediário/resistente a pelo menos um carbapenêmico) na proporção de 1,20 vezes de 2011/2012 (25/39-64,10%) para 2015/2016 (123/231-53,24%) nos isolados de *P. aeruginosa* e redução similar (1,19 vezes) para *Acinetobacter* spp. que em 2011/2012 era 31/35-88,57% e em 2015/2016 foi de 46/62-74,19%.

A redução da resistência aos carbapenêmicos entre os anos de 2011/2012 e 2015/2016 do presente estudo (**Manuscrito 1**), difere de algumas pesquisas: Baumgart; Molinari e Silveira (2010) investigaram a resistência aos carbapenêmicos no Hospital Santa Isabel em Blumenau, Santa Catarina, no período de janeiro de 2004 a dezembro de 2008, onde identificaram que os níveis de resistência de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* foram altos e mostrou tendência de aumento ao longo do período estudado. Zhang e colaboradores (2014) identificaram em seu estudo, na China, com culturas sanguíneas, dos anos 2004-2011, que nos isolados de *K. pneumoniae*, *A. baumannii* e *P. aeruginosa* a resistência aos carbapenêmicos (imipenem e meropenem) também foi significativamente aumentada e foi > 80,0% nos *A. baumannii* isolados em 2011.

Ações ativas da CCIH do HUSM, que envolvem a capacitação dos profissionais que atuam no hospital e a conduta rigorosa na dispensação dos antimicrobianos, certamente foram um dos fatores que contribuíram para a redução de aproximadamente 1,2 vezes da resistência aos carbapenêmicos e de outros antimicrobianos. No Brasil, desde 2013 as condutas adotadas pelas CCIH seguem as recomendações da Nota Técnica nº 01/2013 que estipula medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias MDRs, buscando a prevenção e o controle da disseminação e propagação desses agentes infecciosos (BRASIL, 2013b).

Além da investigação da resistência bacteriana aos antimicrobianos, esta pesquisa avaliou a metodologia convencional (difusão do disco) e metodologias automatizadas (MicroScan[®]-SIEMENS e VITEK[®]2-bioMérieux) na identificação da resistência ao carbapenêmico meropenem, comparando estas ao método de microdiluição em caldo (**Manuscrito 2**). Devido que o tratamento de infecções causadas por microrganismos depende

quase que exclusivamente dos resultados de testes de suscetibilidade aos antimicrobianos e estes dados devem ser conhecidos para obtermos informações corretas e assim, adotar o tratamento efetivo (ARDEBILI; TALEBI; LARI, 2016).

A capacidade de um teste em diagnosticar corretamente a característica investigada, no caso da presente pesquisa a resistência ao meropenem, refere-se ao padrão sensibilidade de um teste. Já a capacidade de detectar os verdadeiros negativos (isolados que não apresentam tal resistência) declara-se especificidade. Considerando esses parâmetros pode-se dizer que os melhores desempenhos das metodologias testadas foram a difusão do disco que apresentou 91% de sensibilidade e 77% de especificidade, assim como o MicroScan[®]-SIEMENS que evidenciou 100% de sensibilidade e 77% de especificidade. Porém, para o VITEK[®]2-bioMérieux a sensibilidade foi de 97% e 55% de especificidade. Pesquisadores chineses, ao avaliarem o desempenho de três sistemas de identificação automatizada (MicroScan WalkAway 96 Plus[®], Phoenix 100 e Vitek 2 Compact[®] para a detecção de *Enterobacteriaceae* resistente aos carbapenêmicos em um Hospital Universitário Chinês. Eles identificaram 93,8% de sensibilidade e 42,3% de especificidade para o MicroScan WalkAway 96 Plus[®] e 75% e 36,4% respectivamente para o Vitek 2 Compact[®]. Neste estudo esses autores também realizaram a confirmação da resistência por PCR e sequenciamento, assim eles puderam afirmar que estas duas metodologias são mais confiáveis na identificação clínica de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos (HE et al., 2016).

Analisando a taxa de erros (**Manuscrito 2**) verificou-se que a difusão do disco apresentou 8,82% de erros maiores e 22,22% de erros menores. No entanto, apresentou boa concordância Kappa= 0,688 com o método padrão (microdiluição em caldo), diferentemente do VITEK[®]2-bioMérieux que teve 2,94% de erros maiores e 44,44% de erros menores e o Kappa foi 0,577, mostrando uma concordância regular. Feinstein & Cicchetti (1990) relataram que em algumas situações raras (ou patologias raras) o teste Kappa tende a subestimar o nível de concordância de uma metodologia. Neste sentido, cabe ressaltar que nenhuma metodologia deve ser descartada, analisando-se apenas a estatística do método e se possível for, é aconselhável associar duas metodologias para a detecção da resistência ao meropenem.

Atualmente, o setor de microbiologia do Laboratório de Análises Clínicas do HUSM faz uso do sistema automatizado VITEK[®]2-bioMérieux para identificação bacteriana e avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos. A orientação é sempre testar adicionalmente outra metodologia (Etest[®]; difusão do disco) quando o isolado apresentar o perfil resistente aos carbapenêmicos ou à colistina na automação. Além disso, no laudo deve constar a

informação de ser uma cepa “selvagem” ou que apresenta um provável mecanismo de resistência (alto nível de resistência aos carbapenêmicos; perda de porina; provável produtor de carbapenemase).

Destaca-se que o presente estudo aqui descrito consiste no primeiro a investigar a resistência à colistina em isolados de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. realizado no HUSM. Além disso, foi o primeiro a constatar a redução da resistência aos carbapenêmicos em diferentes anos, bem como a avaliar metodologias para identificação da resistência ao meropenem nestes microrganismos. Diante dos resultados apresentados, espera-se impulsionar novos interesses em investigações de mecanismos de resistência em BGN-NF tendo em vista que estes são os principais agentes etiológicos de infecções nosocomiais.

4 CONCLUSÕES

Baseado nos resultados apresentados nesta tese, em forma de publicações científicas, pode-se concluir que:

- *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. apresentaram menores taxas de resistência frente ao antimicrobiano colistina do que em outros nosocômios e foi constatado que os isolados de 2015/2016 de *Acinetobacter* spp. aumentaram a suscetibilidade frente a maioria dos antimicrobianos testados. Ocorreu um aumento nas taxas de suscetibilidade mais expressivo frente à amicacina (14,28% (2011/2012) para 80,64% (2015/2016) nos isolados de *Acinetobacter* spp.;

- Nos isolados de *P. aeruginosa* verificou-se uma redução da resistência aos carbapenêmicos em uma proporção de 1,20 vezes de 2011/2012 (25/39-64,10%) para 2015/2016 (123/231-53,24%) e nos *Acinetobacter* spp. a redução foi similar (1,19 vezes), nos quais em 2011/2012 era 31/35-88,57% e em 2015/2016 foi de 46/62-74,19%. A resistência aos carbapenêmicos nos dois períodos (2011/2012 e 2015/2016) prevaleceu na faixa etária de 41-69 anos e considerando os espécimes clínicos, a maior prevalência de isolamento de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp., resistentes aos carbapenêmicos, foram as secreções respiratórias. A UTI-Adulto foi a unidade hospitalar em que as amostras de *P. aeruginosa* de 2011/2012 e 2015/2016 e *Acinetobacter* spp. de 2011/2012 resistentes aos carbapenêmicos apresentaram o maior isolamento e os isolados de *Acinetobacter* spp. de 2015/2016 prevaleceram no Bloco cirúrgico e Sala de Recuperação;

- A difusão do disco para o meropenem apresentou 91% de sensibilidade, 77% de especificidade e 86% de acurácia, enquanto a metodologia automatizada MicroScan[®]-SIEMENS para avaliar a resistência ao carbapenêmico meropenem evidenciou, 100%, 77% e 92%, respectivamente e o VITEK[®]2-bioMérieux a sensibilidade foi de 97%, 55% de especificidade e 82% de acurácia;

- A metodologia de difusão do disco demonstrou boa concordância com o método padrão (Kappa= 0,688) e a metodologia automatizada MicroScan[®]-SIEMENS a concordância foi maior (Kappa= 0,820). No entanto, o sistema automatizado VITEK[®]2-bioMérieux a concordância com o método padrão foi regular (Kappa= 0,577). Por apresentar elevada sensibilidade, especificidade e boa e ótima concordância com a metodologia padrão respectivamente, recomenda-se o método de difusão do disco e o sistema automatizado MicroScan[®]-SIEMENS para identificação da resistência ao meropenem;

- Foi detectada a resistência à colistina em nove isolados de *P. aeruginosa* (9/231-3,89%) e nenhum de *Acinetobacter* spp.;
- Os isolados resistentes à colistina apresentaram-se simultaneamente, 66,67% resistentes aos antimicrobianos imipenem, meropenem e ceftazidima. A maior suscetibilidade foi evidenciada para o antimicrobiano amicacina (77,78%).

REFERÊNCIAS

- AL-JUDAIBI, E. Infection and Antibiotic Resistant Bacteria in Developing Countries: A Genetic Review. **Journal of Microbiology Research**, v. 4, n. 6A, p. 10-17, 2014.
- AMBLER, R. P. The structure of β -lactamase. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 289, n. 36, p. 321-331, 1980.
- ARDEBILI, A.; TALEBI, M.; LARI, A. R. Comparison of Disk Diffusion and E-Test with the Reference Method of Microbroth Dilution for Susceptibility Testing of *Acinetobacter baumannii* Isolates to Tetracyclines. **Medical Laboratory Journal**, v. 10, n. 1, p. 44-49, 2016.
- ATROUNI, A. et al. Reservoirs of *non-baumannii Acinetobacter* species. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1-12, 2016.
- BABAY, H. A. H. et al. Accuracy of detecting resistance to carbapenems among Gram negative rods: comparison of three methods. **Journal of Taibah University Medical Sciences**, v. 4, n. 1, p. 53-61, 2009.
- BAUMGART, A. M. K.; MOLINARI, M. A.; SILVEIRA, A. C. O. Prevalence of carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in high complexity hospital. The **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 5, p. 433-436, 2010.
- BECEIRO, A.; TOMÁS, M.; BOU, G. Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 2, p. 185-230, 2013.
- BEIRAO, E. M. et al. Clinical and microbiological characterization of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* infections in Brazil. **Brazilian Journal Infect Diseases**, v. 15, n. 1, p. 69-73, 2011.
- BHATTACHARYA, M.; PARAKH, A.; NARANG, M. Tigecycline. **Journal of Postgraduate Medicine**, v. 55, n. 1, p. 65-8, 2009.
- BOGDANOVICH, T. et al. Colistin-resistant, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Klebsiella pneumoniae* belonging to the international epidemic clone ST258. **Clinical Infectious Diseases**, v. 53, n. 4, p. 373-376, 2011.
- BOO, T. W.; WALSH, F.; CROWLEY, B. First report of OXA-23 carbapenemase in clinical isolates of *Acinetobacter* species in the Irish Republic. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, p. 1101-1102, 2006.
- BOUCHER, H. W. et al. Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. **IDSA Report on Development Pipeline**, v. 48, p. 1-12, 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Comunicado de Risco N° 01/2016 – GVIMS/GGTES/ANVISA**. Detecção do gene responsável pela resistência à polimixina mediada por plasmídeos (*mcr-1*) no Brasil. 06 de outubro de 2016. Disponível em: <http://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/alertas/item/comunicado-de-risco-01-2016>. Acesso em: 26 out. 2016.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde**. Módulo 6: Detecção e identificação de bactérias de importância médica. 9 volumes, 2013a. 150 p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Nota Técnica N° 1/2013**. Medidas de prevenção e controle de infecções por Enterobactérias multiresistentes. 17 de abril de 2013b.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Nota Técnica N°1/2010**. Medidas para identificação, prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde por microrganismos multiresistentes de 25/10/2010b.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada – RDC N° 44, de 26 de outubro de 2010. **Dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição médica, isoladas ou em associação e dá outras providências**. 26 de outubro de 2010a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada – RDC N° 20, de 05 de maio de 2011. **Dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição, isoladas ou em associação**. 05 de maio de 2011.

BRUSSELAERS, N.; VOGELAERS, D.; BLOT, S. The rising problem of antimicrobial resistance in the intensive care unit. **Annals of Intensive Care**, v. 1, n. 47, p. 1-7, 2011.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A functional classification scheme for β -Lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 6, p. 1211-1233, 1995.

BUSH, K. New β -lactamases in Gram-negative bacteria: Diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, p. 1085-1089, 2001.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated Functional Classification of Beta-lactamases. **Antimicrob Agents and Chemotherapy**. v. 54, n. 3, p. 969-976, 2010.

CAPONE, A. et al. High rate of colistin resistance among patients with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection accounts for an excess of mortality. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 1, p. E23-E30, 2013.

CASTANHEIRA, M. et al. Molecular characterization of a β -lactamase gene, bla GIM-1, encoding a new subclass of metallo- β -lactamases. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 48, n. 12, p. 4654-4661, 2004.

CAUMO, K. et al. Resistência bacteriana no meio ambiente e implicações na clínica hospitalar. **Revista Liberato**, n. 16, v. 11, 2010.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013. Disponível em: <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>. Acesso em: 08 mar. 2017.

D'AZEVEDO, et al. Evaluation of the automated system Vitek 2 for identification and antimicrobial susceptibility testing of brazilian Gram-positive cocci Strains. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 13, n. 2, p. 107-110, 2009.

DAS, N. K. et al. Prevalence of carbapenem resistance and comparison between different phenotypic methods for detection of metallo-B-lactamases in Gram negative non-fermentative bacteria in the acute wards of a tertiary care centre. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 5, n. 5, p. 109-119, 2016.

DAVIS, K. A. et al. Multidrug-resistant *Acinetobacter* extremity infections in soldiers. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, p. 1218-1224, 2005.

DIJKSHOORN, L.; NEMEC, A.; SEIFERT, H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Nature Reviews Microbiology**, n. 5, p. 939-951, 2007.

DOUGHARI, H. J. et al. The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: an overview. **Microbes and Environments**, v. 26, n. 2, p. 101-112, 2011.

DOUMITH, M. et al. Detection of the plasmid-mediated *mcr-1* gene conferring colistin resistance in human and food isolates of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* in England and Wales. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 8, p. 2300-2305, 2016.

DU, H. et al. Emergence of the *mcr-1* colistin resistance gene in carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 3, p. 287-288, 2016.

ENANI, M. A. Antimicrobial resistance Insights from the declaration of world alliance against antibiotic resistance. **Saudi Medical Journal**, v. 36, n. 1, p. 11-12, 2015.

FALAGAS, M. E. et al. Antibiotic treatment of infections due to carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: Systematic evaluation of the available evidence. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 2, p. 654-663, 2014.

FALAGAS, M. E.; KASIAKOU, S. K. Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies. **Critical Care**, v. 10, n. 1, p. 1-13, 2006.

FEINSTEIN, A. R.; CICCHETTI, D. V. High agreement but low kappa: I. the problems of two paradoxes. **Journal of Clinical Epidemiology**, v. 43, n. 6, p. 543-549, 1990.

FERNANDES, M. R. et al. First report of the globally disseminated IncX4 plasmid carrying the *mcr-1* gene in a colistin-resistant *Escherichia coli* ST101 isolated from a human infection in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 10, p. 6415-6417, 2016.

- FERREIRA, A. E. et al. Molecular characterization of clinical multiresistant isolates of *Acinetobacter* sp. from hospitals in Porto Alegre, state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 6, p. 725-730, 2011.
- FOURNIER, P. E.; RICHEL, H. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. **Clinical of Infectious Diseases**, v. 42, p. 692-699, 2006.
- FRANKLIN, C.; LIOLIOS, L.; PELEG, A. Y. Phenotypic detection of carbapenem susceptible metallo- β -lactamase - producing Gram-negative bacilli in the clinical laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3139-3144, 2006.
- GALES, A. C.; JONES, R. N.; SADER, H. S. Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54 731 clinical isolates of Gram-negative bacilli: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2001-2004). **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, n. 4, p. 315-321, 2006.
- GALES, A. et al. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY antimicrobial surveillance program (Latin America, 2008–2010). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, p. 354-360, 2012.
- GAYNES, R.; EDWARDS, J. R. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. **Clinical Infectious Diseases**, n. 41, p. 848-854, 2005.
- GILLHAM, M. I. et al. Variable antibiotic susceptibility in populations of *Pseudomonas aeruginosa* infecting patients with bronchiectasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, p. 728-732, 2009.
- GOLI, H. R. et al. Emergence of colistin resistant *Pseudomonas aeruginosa* at Tabriz hospitals, Iran. **Iranian Journal Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 62-69, 2016.
- GÓMEZ-GARCÉS, J. L. et al. Actividad in-vitro de fosfomicina, sola o en combinaciones, frente a aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 34, n. 4, p. 228-231, 2016.
- GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.
- HE, Q. et al. Performance evaluation of three automated identification systems in detecting carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. **Annals Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 15, n. 40, p. 1-6, 2016.
- HIRSCH, E. B.; TAM, V. H. Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes. **Expert review of pharmacoeconomics & outcomes research**, v.10, n. 4, p. 441-451, 2010.
- KANJ, S. S.; KANAFANI, Z. A. Current Concepts in Antimicrobial Therapy Against Resistant Gram-Negative Organisms: Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae*, Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*, and Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 86, n. 3, p. 250-259, 2011.

KARAM, G. et al. Antibiotic strategies in the era of multidrug resistance. **Critical Care**, v. 20 n. 136, p. 1-9, 2016.

KARMOSTAJ, A.; PEERAYEH, S. N.; SALMANIAN, A. H. Emergence of tigecycline resistant *Acinetobacter baumannii* from an Intensive Care Unit (ICU) in Tehran.

Jundishapur Journal of Microbiology, n. 6, v. 3, p. 215-219, 2013.

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

KIRATISIN, P. et al. Comparative in vitro activity of carbapenems against major Gram-negative pathogens: results of Asia-Pacific surveillance from the COMPACT II study.

International Journal of Antimicrobial Agents, v. 39, p. 311-316, 2012.

KONEMAN, et al. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**/Washington C. Winn Jr. [et al.]; revisão técnica Eiler Fritsch Toros ; tradução Eiler Fritsch Toros [et al.]. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.

LAURETTI, L. et al. Cloning and characterization of bla_{VIM}, a new integron-borne metallo-β-lactamase gene from *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 43, n. 7, p. 1584-1590, 1999.

LEE, C. S.; DOI, Y. Therapy of infections due to carbapenem-resistant Gram negative pathogens. **Infect Chemother**, v. 46, n. 3, p. 149-164, 2014.

LEE, K. et al. Novel acquired metallo-β-lactamase gene, bla_{SIM-1}, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 49, n. 11, p. 4485-4491, 2005.

LENTZ, S. A. et al. Letter to the editor: *Escherichia coli* harbouring *mcr-1* gene isolated from poultry not exposed to polymyxins in Brazil. **European Surveillance**, v. 21, n. 26, p. 29-30, 2016.

LIU, Y. et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 161-168, 2016.

MACHADO, G. M. et al. Occurrence and the susceptibility to antimicrobial agents in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* sp. at a tertiary hospital in southern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 2, p. 168-172, 2011.

MARKELZ, A. E. et al. Carbapenem susceptibility testing errors using three automated systems, disk diffusion, Etest, and broth microdilution and carbapenem resistance genes in isolates of *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* Complex. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 10, p. 4707-4711, 2011.

MARKOU, N. et al. Intensive Care Unit B: colistin serum concentrations after intravenous administration in critically ill patients with serious multidrug-resistant, Gram-negative bacilli infections: a prospective, open-label, uncontrolled study. **Clinical Therapeutics**, v. 30, n. 1, p. 143-151, 2008.

- MARTINS, N. et al. Severe infection in a lung transplant recipient caused by donor transmitted carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Transplant Infectious Disease**, v. 13, n. 3, p. 316-320, 2012.
- MAYER, L. E. et al. Evaluation of bacterial growth inhibition by mercaptopropionic acid in metallo- β -lactamase detection on multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 2, p. 253-254, 2012.
- MESAROS, N. et al. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13, n. 6, 2007.
- MEYER, G.; PICOLI, S. U. Fenótipos de betalactamases em *Klebsiella pneumoniae* de hospital de emergência de Porto Alegre. **Brazilian Journal of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 47, n. 1, p. 25-31, 2011.
- MOODLEY, V. M. et al. Evaluation of five susceptibility test methods for detection of tobramycin resistance in a cluster of epidemiologically related *Acinetobacter baumannii* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 8, p. 2535-2540, 2013.
- MORAES, D. et al. Prevalence of uropathogens and antimicrobial susceptibility profile in outpatient from Jataí-GO. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 50, n. 3, p. 200-204, 2014.
- MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 960 p.
- NEVES, P. R. et al. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 4, p. 409-420, 2011.
- NORDMANN, P.; CORNAGLIA, G. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: a call for action! **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 5, p. 411-2, 2012.
- NORDMANN, P.; POIREL, L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 8, n. 6, p. 321-331, 2002.
- OLAITAN, A. O. et al. Worldwide emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* from healthy humans and patients in Lao PDR, Thailand, Israel, Nigeria and France owing to inactivation of the PhoP/PhoQ regulator *mgr* B: an epidemiological and molecular study. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 44, p. 500-507, 2014.
- OLAITAN, A. O.; MORAND, S.; ROLAIN, J. Emergence of colistin-resistant bacteria in humans without colistin usage: a new worry and cause for vigilance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 47, n. 1, p. 1-3, 2016.
- OPLUSTIL, C. et al. **Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2010.

- PAIM, T. G. S.; CANTARELLI, V.; D'AZEVEDO, P. A. Performance of the Vitek 2 system software version 5.03 in the bacterial identification and antimicrobial susceptibility test: evaluation study of clinical and reference strains of Gram-positive cocci. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 3 p. 777-38, 2014.
- PAOLUCCI, M.; LANDINI, M. P.; SAMBRI, V. Conventional and molecular techniques for the early diagnosis of bacteraemia. **International Journal of Antimicrobial Agents**, n. 36, p. S6-16, 2010.
- PELEG, A. Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D. L. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 3, p. 538-582, 2008.
- PEREIRA, C. A. P. et al. Nosocomial Bloodstream Infections in Brazilian Pediatric Patients: Microbiology, Epidemiology, and Clinical Features. **Bloodstream Infection Surveillance**, v. 8, n. 7, 2013.
- POIREL, L. et al. Characterization of bla-DIM-1, a novel integron-located metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas stutzeri* clinical isolate in the Netherlands. In: **Anais do 19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID)**, Helsinki, Finlândia, 2009.
- POIREL, L.; NORDMANN, P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. **Clinical Microbiology Infection**, v. 12, n. 9, p. 826-836, 2006.
- POOLE, K. Resistance to β -lactam antibiotics. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, n. 17, p. 2200-23, 2004.
- QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the Versatile β -Lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 3, p. 440-458, 2007.
- RAMPELOTTO, R. F. et al. Assessment of coagulase-negative *Staphylococci* isolated from blood cultures of patients with leukemia in the period 2009-2011. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 36, n. 3, p. 385-390, 2015.
- RHOUMA, M.; BEAUDRY, F.; LETELLIER, A. Resistance to colistin: what is the fate for this antibiotic in pig production? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 48, n. 2, p. 119-126, 2016.
- RICE, L. B. Challenges in identifying new antimicrobial agents effective for treating infections with *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, suppl. 2, p. S100-S105, 2006.
- RIGATTI, F. et al. Bacteremias por *Staphylococcus coagulase* negativos oxacilina resistentes em um hospital escola na cidade de Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 6, p. 686-690, 2010.
- RODRIGUES, M. A. et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a University Hospital in the South of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, n. 1, p. 35-41, 2015.

ROSSI, F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. **Antimicrobial Resistance**, v. 52, p. 1138-1143, 2011.

SADER, H. S.; FRITSCH, T. R.; JONES, R. N. Accuracy of Three Automated Systems (MicroScan WalkAway, VITEK, and VITEK 2) for Susceptibility Testing of *Pseudomonas aeruginosa* against Five Broad-Spectrum Beta-Lactam Agents. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 3, 2006.

SANTAJIT, S.; INDRAWATTANA, N. Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE Pathogens. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1-8, 2016.

SANTOS, A. F. et al. Evaluation of MALDI-TOF MS in the microbiology laboratory. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 49, n. 3, p. 191-197, 2013.

SANTOS, S. O.; BREZOLIN, D.; HÖRNER, R. *Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos no Hospital Universitário de Santa Maria, Rio Grande do Sul. **Scientia Medica**, v. 24, n. 2, p. 150-155, 2014.

SEIBERT, G. et al. Infecções hospitalares por enterobactérias produtoras de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase em um hospital escola. **Revista Einstein**, v. 12, n. 3, p. 282-286, 2014.

SEKI, L. M. et al. Molecular epidemiology of KPC-2- producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Brazil: the predominance of sequence type 437. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 70, n. 2, p. 274-277, 2011.

SEKIGUCHI, J. et al. KHM-1, a novel plasmid-mediated metallo- β -lactamase from a *Citrobacter freundii* clinical isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 11, p. 4194-4197, 2009.

SHARMA, S.; SRIVASTAVA, P. Resistance of antimicrobial in *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 5, n. 3, p. 121-128, 2016.

SHENG, W. et al. A multicenter study of risk factors and outcome of hospitalized patients with infections due to carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14; p. e764-e769, 2010.

SIQUEIRA, V. L. D. et al. High genetic diversity among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. isolated in a public hospital in Brazil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science**, v. 49, n. 1, p. 49-56, 2013.

TOLEMAN, M. A. et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 50, p. 673-679, 2002.

TRIFI, A. et al. Efficacy and toxicity of high-dose colistin in multidrug-resistant Gram-negative bacilli infections: A comparative study of a matched series. **Chemotherapy**, v. 16, n. 61, p. 190-196, 2015.

VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis. **Pharmacy and Therapeutics**, v. 40, n. 4, p. 277-283, 2015.

WALSH, T. R. et al. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 2, p. 306-325, 2005.

WATANABE, M. et al. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 35, n. 1, p. 147-151, 1991.

WOODFORD, N. et al. Comparison of BD Phoenix, Vitek 2, and MicroScan automated systems for detection and inference of mechanisms responsible for carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 8, p. 2999-3002, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance, 2014. Disponível em: <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>. Acesso em: 08 mar. 2017.

WORTHINGTON, R. J.; MELANDER, C. Combination approaches to combat multi-drug resistant bacteria. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 3, p. 177-184, 2013.

YONG, D. et al. A novel sub-group metallo-beta-lactamase (MBL), AIM-1 emerges in *Pseudomonas aeruginosa* (PSA) from Australia. In **47th Interscience Conference in Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC)**, n. C1-539. Chicago, USA, 2007.

YONG, D. et al. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, *bla*_{NDM-1}, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 12, p. 5046-5054, 2009.

ZAVASCKI, A. P. et al. KPC-2-producing *Enterobacter cloacae* in two cities from Southern Brazil. **International Journal Antimicrobial Agents**, v. 34, n. 3, p. 286-288, 2009.

ZAVASCKI, A. P. et al. KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: a widespread threat in waiting? **International Journal Infectious Diseases**, v. 14, n. 6, p. 539-540, 2010.

ZAVASCKI, A. P. et al. Polymyxin b for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, p. 1-10, 2007.

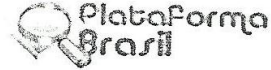
ZHANG, X. Increasing resistance rate to carbapenem among blood culture isolates of *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in a university-affiliated hospital in China, 2004–2011. **The Journal of Antibiotics**, v. 68, n. 2, p. 115-120, 2014.

ANEXOS

ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA MARIA/ PRÓ-REITORIA
DE PÓS-GRADUAÇÃO E



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE AOS ANTIBACTERIANOS E DOS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DE BACTÉRIAS ISOLADAS NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE SANTA MARIA

Pesquisador: Rosmari Horner

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 38850614.4.0000.5346

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Maria/ Pró-Reitoria de Pós-Graduação e

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 928.497

Data da Relatoria: 12/01/2015

Apresentação do Projeto:

As infecções hospitalares constituem uma importante causa de aumento da morbidade e mortalidade dos pacientes e contribui diretamente na elevação dos custos assistenciais. Nas últimas décadas, o grande problema têm sido os surtos de infecções hospitalares provocados por microrganismos multirresistentes (MDR) como por exemplo, Staphylococcus aureus resistente à metilicina e Staphylococcus Coagulase Negativa (SCoN), família Enterobacteriaceae, principalmente as produtoras de carbapenemases tipo KPC, Pseudomonas aeruginosa e Acinetobacter spp.

O Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), um hospital terciário, centro de referência em diagnóstico e tratamento na região central do Rio Grande do Sul que recebe pacientes de mais de 30 municípios representa um nosocômio onde este tipo de microrganismo tem probabilidade frequente de isolamento. Torna-se evidente a crescente importância destas bactérias como agentes etiológicos de infecções hospitalares, especialmente pela escassez de esquemas terapêuticos efetivos e pela presença desses microrganismos potencialmente causadores de infecções. Assim, devido à importância no ambiente hospitalar e sua grande capacidade de disseminação, o objetivo deste projeto será efetuar a identificação e avaliação do perfil de sensibilidade frente os antimicrobianos e dos mecanismos de resistência bem como o perfil

Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar
Bairro: Camobi **CEP:** 97.105-970

UF: RS **Município:** SANTA MARIA

Telefone: (55)3220-9362

E-mail: cep.ufsm@gmail.com



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA MARIA/ PRÓ-REITORIA
DE PÓS-GRADUAÇÃO E



Continuação do Parecer: 928.497

epidemiológico das bactérias isoladas no Hospital Universitário de Santa Maria, com a finalidade de contribuir de forma significativa na escolha do tratamento empírico a ser administrado a cada paciente.

Objetivo da Pesquisa:

Efetuar a identificação e avaliação do perfil de sensibilidade frente os antimicrobianos e dos mecanismos de resistência bem como o perfil epidemiológico das bactérias isoladas no Hospital Universitário de Santa Maria.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Descritos de maneira adequada.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Cronograma: aquele apresentado no projeto não é detalhado;

Orçamento: cfme apresentado no projeto, o custo do Material de Consumo é de cerca de R\$ 34 mil, que seria obtido com a submissão do projeto a editais públicos internos e externos.

Termo de Confidencialidade: Ok;

Autorização Institucional: foi apresentada autorização da GEPE;

Registro no GAP: Ok;

Folha de Rosto: Ok;

Registro na GEPE: foi apresentada;

TCLE: foi solicitado, formalmente a dispensa, o que é adequado ao tipo de projeto.

Recomendações:

Veja no site do CEP - <http://w3.ufsm.br/nucleodecomites/index.php/cep> - na aba "orientações gerais", modelos e orientações para apresentação dos documentos. Acompanhe as orientações disponíveis, evite pendências e agilize a tramitação do seu projeto.

Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar

Bairro: Camobi

CEP: 97.105-970

UF: RS

Município: SANTA MARIA

Telefone: (55)3220-9362

E-mail: cep.ufsm@gmail.com



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA MARIA/ PRÓ-REITORIA
DE PÓS-GRADUAÇÃO E



Continuação do Parecer: 928.497

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Como a amostra é de material biológico, optou-se pela aprovação do projeto, mesmo que a mesma não tenha sido justificada.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SANTA MARIA, 05 de Janeiro de 2015

Assinado por:
CLAUDEMIR DE QUADROS
(Coordenador)


Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar
Bairro: Camobi CEP: 97.105-970
UF: RS Município: SANTA MARIA
Telefone: (55)3220-9362

E-mail: cep.ufsm@gmail.com

ANEXO B – PUBLICAÇÃO DO ARTIGO 1


Documento descarregado de <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2016.03.004>. Cópia para uso pessoal, se proíbe a transmissão de este documento por qualquer modo e formato.

BJID / INFECT DIS 2016, 2 (4): 649-650




The Brazilian Journal of
INFECTIOUS DISEASES

www.elsevier.com/locate/bjid



Letter to the Editor



Colistin resistance in non-fermenting Gram-negative bacilli in a university hospital

Dear Editor,

Indiscriminate use of antimicrobials has caused the worldwide emergence of multidrug resistant bacteria (MDR). Glucose non-fermenting Gram-negative bacilli (NF-GNB) that show resistance to several antimicrobials, including colistin, have been reported. The highest rates of this type of resistance have been registered in Asia and Europe.¹ This fact has created problems in therapy, since the colistin is used as last alternative to treat infections caused by MDR bacteria.² *Pseudomonas aeruginosa* is a skillful microorganism that causes severe opportunistic infections in immunocompromised patients due to its metabolic versatility.³ Isolation of *P. aeruginosa* resistant to almost all available antimicrobials is increasing in Intensive Care Units (ICU), leading to an increase in the number of healthcare-associated infections (HAI), significantly influencing morbidity, mortality, and high costs of treatment of infected patients.¹

In a prospective study developed between August 2015 and January 2016 we isolated 293 NF-GNB of various clinical specimens from patients admitted to a university hospital in the central region of Rio Grande do Sul, Brazil. Identification and antimicrobials sensitivity test were performed through the automated system VITEK®2 (bioMérieux). Data were interpreted according to the document M100-S25 of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015), considering resistant the isolated specimens which showed intermediate or resistant colistin profiles.

From the 293 NF-GNB assessed in this study, only two genera were identified: 78.83% (231) *P. aeruginosa* and 21.16% (62) *Acinetobacter* spp. Colistin resistance was identified in nine isolated strains of *P. aeruginosa* (9/231-3.89%) and none in *Acinetobacter* spp. The predominant age group of patients in whom colistin-resistant strains were identified was 41-69 years old (77.77%); this age-range also showed expressive resistance to carbapenems (66.67%) (Table 1).

Colistin-resistant *P. aeruginosa* were predominantly isolated from clinical specimens obtained from soft tissues (3/9-33.33%) and respiratory (sputum and tracheal secretion - 2/9-22.22%) secretions. The hospital wards in which resistant strains were initially identified were internal medicine (2/9-22.23%), surgery (2/9-22.23%), recovery room (2/9-22.23%), nephrology, adult ER, and ICU (1/9-11.11% each).

From the nine patients in whom colistin-resistant *P. Aeruginosa* was isolated, three progressed to death due to septicemia, four were oncologic patients under anti-neoplastic and radiotherapy regimens, one post-kidney transplant patient, two diabetes mellitus patients, and two chronic smokers/alcoholics. Therefore, we ratify that patients' immunodepression make them vulnerable to infections caused by colistin-resistant microorganisms.

The extensive use of colistin in veterinary medicine to treat gastrointestinal infections caused by Enterobacteriaceae has contributed to chromosomal mutations mediated by the plasmid *mcr-1* to codify resistance to colistin in Gram-negative bacilli. Fernandes and colleagues reported on the evidence of *mcr-1* originated from *Escherichia coli* isolated from food of animal origin in Brazil since 2012.⁴ This silent dissemination of *E. coli* resistance mediated by this plasmid is having an impact in Brazilian ICUs. The emergence and dissemination of MDR bacteria associated with high rates of treatment failure have fostered the use of poliximins, the main therapeutic option for the treatment of MDR infections, especially those caused by *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, and *Klebsiella pneumoniae*, producers of SPM-1, OXA-23 or KPC-2.⁵ Additional studies are being developed by our research group to identify the gene *mcr-1* in isolated strains that show resistance to colistin.

Table 1 - Sensitivity profile of 9 *P. aeruginosa* isolates resistant to colistin.

Antimicrobial	Sensitive (n-%)	Resistant (n-%)
Amikacin	7-77, 78%	2-22, 23%
Gentamicin	5-55, 56%	4-44, 45%
Cefepime	5-55, 56%	4-44, 45%
Ciprofloxacin	4-44, 45%	5-55, 56%
Piperacillin-Tazobactam	3-33, 34%	5-55, 56%
Ampicillin-Subactam	0	9-100%
Imipenem	3-33, 34%	6-66, 67%
Meropenem	3-33, 34%	6-66, 67%
Ceftazidime	3-33, 34%	6-66, 67%

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Cai Y, Chai D, Wang R, Liang B, Bai N. Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. *J Antimicrob Chemother.* 2012;22:1-9.
2. Olaitan AQ, Morand S, Rolain JM. Emergence of colistin-resistant bacteria in humans without colistin usage: a new worry and cause for vigilance. *Int J Antimicrob Agents.* 2016;47:1-3.
3. Cellatly SL, Hancock RFW. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog Dis.* 2013;67:159-73.
4. Fernandes MR, Moura Q, Sartori L, et al. Silent dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contribute to the global spread of the *mcr-1* gene. *Euro Surveill.* 2016;21:1-6.
5. Rossi F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. *Clin Infect Dis.* 2011;52:1138-43.

Silvana Oliveira dos Santos^a, Sthefanine Martins La Rocca^b, Rosmari Hörner^{c,*}

^a Universidade Federal de Santa Maria, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Santa Maria, RS, Brazil

^b Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^c Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Santa Maria, RS, Brazil

*Corresponding author.

E-mail address: rosmari.ufsm@gmail.com (R. Hörner).

Received 9 August 2016

Accepted 20 August 2016

1413-8670/© 2016 Sociedade Brasileira de Infectologia.

Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access

article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2016.08.009>

Available online 15 October 2016

ANEXO C – SUBMISSÃO DO MANUSCRITO 1

Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences



Assessment of resistance to carbapenems in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. isolated in a tertiary hospital

Journal:	<i>Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	dos Santos, Silvana ; Universidade Federal de Santa Maria, Análises Clínicas e Toxicológicas Hörner, Rosmari; Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas Rodrigues, Mônica ; Universidade Federal de Santa Maria, Análises Clínicas e Toxicológicas Bottega, Angelita ; Universidade Federal de Santa Maria, Análises Clínicas e Toxicológicas Silva, Danielly ; Universidade Federal de Santa Maria, Análises Clínicas e Toxicológicas Rampelotto, Roberta; Universidade Federal de Santa Maria
Keyword:	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> spp, Carbapenems