CLÁUDIA MARIA DANTAS DE MAIO CARRILHO

**Caracterização clínica, microbiologia e molecular e tratamento de
infecções por enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Figueiredo Costa

**SÃO PAULO
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Carrilho, Cláudia Maria Dantas de Maio.

Caracterização clínica, microbiológica e molecular e tratamento de infecções por enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos / Cláudia Maria Dantas de Maio Carrilho. -- São Paulo, 2014.

Tese (doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientadora: Sílvia Figueiredo Costa.

Descritores: 1. Enterobacteriaceae 2. Farmacorresistência bacteriana múltipla
3. Carbapenêmicos 4. Polimixinas

USP/FM/DED-438/14

Dedicatória

À Família:

Deus, nosso pai, e Virgem Maria, nossa mãe

Meus pais, Horácio e Rosa

Alexandre, Artur e Bruno

D. Lali

Irmãos, sobrinhos e cunhados

Em especial:

Aos pacientes que não resistiram à resistência antimicrobiana ou não se beneficiaram com os avanços da infectologia, em especial à querida Márcia

Regina Bernardes

Agradecimentos

A Deus, pela oportunidade, inspiração e otimismo durante esse trabalho.

À amiga, orientadora e cientista, Profa. Dra. Silvia F Costa, pela paciência, pelo conhecimento, seriedade, exemplo e dedicação aos pós-graduandos.

À Profa. Dra. Anna Sara, que comanda a Pós-graduação de modo brilhante, enriquece-nos com seu conhecimento, experiência e pragmatismo.

Ao Prof. Dr. Aluízio C Segurado, coordenador da Pós-graduação no início de meu trabalho, pelo estímulo e apoio.

À equipe profissional e capacitada do LIM-54, Larissa, Juliana, Inneke, Gleice, Letícia e demais colaboradores, pelo trabalho com as amostras e parceria.

À Roseli e demais profissionais da Pós Graduação em Doenças Infecciosas da Faculdade de Medicina de São Paulo pela atenção carinhosa dispensada nesse período.

À Profa Mariana Ragassi Urbano, do Departamento de Estatística da UEL, que me atendeu prontamente na elaboração das análises, mesmo com aquela linda e enorme barriga que deu à luz, Érica.

À minha querida irmã e companheira de doutorado, jornalista Ana Maio, pela revisão do texto.

Aos cunhados maravilhosos Jessica e Otto, por terem acolhido a mim e minha muleta em sua casa durante estadia em São Paulo.

Às amigas queridas, que tornam nosso dia mais agradável na CCIH do HU: Renata, Joseani, Jaqueline, Nick, Regina, Neuza, Marsileni, Márcia, pela compreensão e paciência naqueles momentos.

À Jamile Sardi Perozin, ex-aluna e agora dedicada colega de trabalho, pelo agradável convívio e parceria. Se Deus quiser, vamos longe.

À Gerusa, pelo cuidadoso armazenamento das amostras.

Às amigas da Disciplina de Terapia Intensiva, Profas. Dras. Cíntia M Carvalho Grion, Lucienne T Queiroz Cardoso, Josiane Festti , inspiradoras e companheiras.

A todos os amigos, dos vários momentos da minha vida, aqui inanimados, e que têm o poder de nos fazer sorrir.

Aos meus pais, Horácio e Rosa, pelo exemplo, ternura e apoio na minha carreira.

Ao Alexandre, pelo amor, dedicação, paciência e companheirismo em todos esses maravilhosos anos.

Aos meus amores, Artur e Bruno, pela paciência com minha ausência física e emocional nesse período e pelo amor e encantamento que não imaginava que pudesse existir.

Aos pacientes, que voluntariamente ou não, ajudam a ciência em muitos avanços e descobertas, em especial aqueles que não sobreviveram para partilhar do sucesso.

Normatização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento de sua publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L.Freddi, Maria F.Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviatura dos títulos e periódicos de acordo com Lista of Journals Indexed in Index Medicus.

Sumário

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**LISTA DE TABELAS****LISTA DE GRÁFICOS****LISTA DE FIGURAS****RESUMO****SUMMARY**

1	INTRODUÇÃO.....	01
1.1	Epidemiologia.....	02
1.2	Fatores de Risco.....	05
1.3	Mecanismo de resistência.....	06
1.4	Tratamento.....	11
1.5	Prevenção e controle.....	20
1.6	Enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos no Brasil.....	23
1.7	Justificativa.....	25
2	OBJETIVO.....	26
2.1	Primários.....	27
2.2	Secundários.....	27
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1	Características do Hospital.....	29
3.2	Delineamento do Estudo	29
3.3	População do estudo.....	30
3.4	Amostragem.....	30
3.5	Definições.....	31
3.6	Coleta de dados.....	33
3.7	Amostras biológicas.....	34
3.7.1	Microdiluição em caldo.....	35
3.7.2	Determinação do sinergismo.....	38
3.7.2.1	Método <i>Time Kill</i>	38
3.7.3	Tipagem Molecular.....	39
3.7.4	Detecção de genes codificadores de KPC, OXA-48 e NDM....	43
3.7.4.1	Extração de DNA.....	43
3.8	Análise estatística.....	44
3.9	Ética.....	45
4	RESULTADOS.....	46

5	DISCUSSÃO.....	73
6	CONCLUSÕES.....	87
7	ANEXOS.....	90
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97

AC	- Ácido clavulânico
AmpC	- β -lactamase induzível
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APACHE	- Acute Physiology and Chronic Evaluation
AS	- Ágar sangue
ATB	- Antimicrobiano
ATCC	- American Type Culture Collection
ATM	- Antimicrobiano
BGN	- Bacilo gram-negativo
BM	- Banho-Maria
Bpm	- Batimentos por minuto
CCIH	- Comissão de Controle de Infecção Hospitalar
CDC	- Centers for Disease Control and Prevention
CHEF-TE	- CHEF-Tris Edta
CID-10	- Código Internacional de Doenças
CIM	- Concentração inibitória mínima
CLSI	- Clinical and Laboratory Standards Institute
Co-inf	- Coinfecção
Col	- Colonização
CR	- Carbapenem-resistente
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
DNS	- Ácido 3,5-dinitro-salicílico
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERC	- Enterobactéria resistente aos carbapenêmicos
ESBL	- β -lactamase de espectro ampliado
EUCAST	- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FDA	- Food and Drug Administration
GES	- β -lactamase
GIM	- β -lactamase
HEPA	- High- Efficiency particulate air
HUL	- Hospital Universitário de Londrina
IC	- Intervalo de confiança
ICS	- Infecção da corrente sanguínea
IMI	- β -lactamase
IMP	- β -lactamase
IPCS	- Infecção primária de corrente sanguínea
IPPM	- Infecção de pele e partes moles
IQR	- Inter quartil range
IRAS	- Infecções relacionadas à assistência à saúde
lrpm	- Incursões respiratórias por minuto
ISC	- Infecção de sítio cirúrgico
ITU	- Infecção de trato urinário
KPC	- <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
LIM	- Laboratório de investigação médica
LOS	- Duração de internação
MDR	- Multidroga resistente
MHCA	- Muller Hinton cátion ajustado
MMWR	- Morbidity and Mortality Weekly Report
MRSA	- <i>S. aureus</i> resistente à meticilina/oxacilina
NDM	- New Delhi Metalo β -lactamase
NHSN	- National Healthcare Safety Network
NMC	- β -lactamase

OMP	- Proteína de membrana externa
OR	- Odds Ratio
OXA	- β -lactamase
PaCO ₂	- Pressão parcial de CO ₂
PAV	- Pneumonia associada à ventilação mecânica
PCR	- Reação em cadeia de polimerase
PFGE	- Eletroforese em campo pulsado
PFT	- Pulsed field type
pK/pD	- Farmacocinética/farmacodinâmica
RR	- Risco relativo
SHV	- β -lactamase
SIM	- β -lactamase
SIRS	- Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
SME	- β -lactamase
SOFA	- Sequential Organ Dysfunction Assessment
SPM	- β -lactamase
SPM	- β -lactamase
SUS	- Sistema Único de Saúde
TBE	- Tris-Borato-EDTA
TEM	- β -lactamase
TGI	- Trato gastro-intestinal
TSA	- Agar triptona de soja
TSB	- Líquido de triptona de soja
UTI	- Unidade de terapia intensiva
VRE	- Enterococo resistente à vancomicina
X-BAI	- Endonuclease de restrição

Tabela 1	Nova classificação da β -lactamases, de 2010.....	8
Tabela 2	Revisão dos principais estudos sobre tratamento de infecções por ERC nos últimos 5 anos.....	16
Tabela 3	Condições de corrida de PFGE para o microrganismo <i>Enterobacter</i> spp.....	42
Tabela 4	Análise univariada dos fatores associados ao óbito relacionado à infecção de 127 pacientes com infecções causadas por ERC entre março de 2011 e dezembro de 2012.....	49
Tabela 5	Tratamento das 127 infecções por ERC em relação ao tempo de início do antimicrobiano e esquemas terapêuticos utilizados, entre março de 2011 e dezembro de 2012.....	52
Tabela 6	Desfecho dos pacientes de acordo com o esquema de tratamento utilizado nas 127 infecções por ERC, de março de 2011 a dezembro de 2012.....	54
Tabela 7	Mortalidade hospitalar, relacionada à infecção, em 30 dias e 14 dias, entre pacientes com infecção por ERC na UTI e fora da UTI, entre março de 2011 e dezembro de 2012.....	55
Tabela 8	Variáveis APACHE de admissão e SOFA de admissão e saída entre os 98 pacientes com infecção por ERC que estiveram na UTI, entre março de 2011 e dezembro de 2012 ..	56
Tabela 9	Variáveis independentes associadas com óbito relacionado à infecção entre 127 pacientes infectados por ERC entre março de 2011 e dezembro de 2012.....	57
Tabela 10	Perfil de sensibilidade das ERC de acordo com CIM e método padronizado.....	58
Tabela 11	Análise univariada dos fatores de risco associados à resistência à polimixina em 127 pacientes com infecções causadas por ERC entre março de 2011 a dezembro de 2012 ..	62
Tabela 12	Análise multivariada dos fatores de risco associados à resistência à polimixina em 127 pacientes com infecções causadas por ERC entre março de 2011 a dezembro de 2012 ..	64
Tabela 13	Análise univariada dos fatores de risco associados ao óbito relacionado à infecção de 27 pacientes com infecções por enterobactérias resistentes às polimixinas, entre março de 2011 e dezembro de 2012.....	65
Tabela 14	Terapia antimicrobiana utilizada por pelo menos 48 horas, óbito relacionado à infecção e presença de sinergismo em 27 pacientes com infecções por enterobactérias resistentes às polimixinas, entre março de 2011 e dezembro de 2012.....	68

Tabela 15	Variação das concentrações inibitórias mínimas (CIM) de polimixina, tigecilina, amicacina e imipenem e sítios de isolamento do agente em 27 pacientes com infecções por enterobactérias resistentes às polimixinas, entre março de 2011 e dezembro de 2012.....	69
Tabela 16	Análise multivariada dos fatores associados ao óbito relacionado à infecção de 27 pacientes com infecções por enterobactérias resistentes às polimixinas, entre março de 2011 e dezembro de 2012.....	69

Gráfico 1	Densidade de incidência por 1.000 pacientes-dia de infecções e colonizações por ERC e mortalidade semestral de pacientes internados em UTIs, de fevereiro de 2009 a dezembro de 2013.....	24
Gráfico 2	Ocorrência de sepse, sepse grave e choque séptico em pacientes com infecção por ERC na UTI e fora da UTI, entre março de 2011 e dezembro de 2012.....	57
Gráfico 3	Curva de sobrevida de Kaplan Meier com avaliação de terapia dupla e tripla nas infecções por ERC , com exceção das infecções de trato urinário.....	59
Gráfico 4	Curva de sobrevida de Kaplan Meier com avaliação de monoterapia, terapia dupla e tripla nas infecções por enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos.....	60
Gráfico 5	Avaliação de sinergismo entre três antimicrobianos pelo método “Time Kill” em isolados resistentes à polimixina.....	70
Gráfico 6	Avaliação de sinergismo entre dois antimicrobianos pelo método “Time Kill” em isolados resistentes à polimixina.....	71

Figura 1	Dendrograma de 18 isolados resistentes à polimixina e que receberam terapia combinada, realizado pela plataforma BioNumerics.....	72
-----------------	---	----

Carrilho, CMDM. *Caracterização clínica, microbiologia e molecular e tratamento de infecções por enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

Introdução: Infecções por Enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos (ERC), em especial produtoras de *Klebsiella pneumoniae* carbapenamase tipo KPC hoje são endêmicas em diversas regiões do mundo, seu tratamento é ainda um grande desafio em particular de isolados resistentes à polimixina.

Objetivos: Descrever as características clínicas, microbiológicas e moleculares das infecções por ERC. **Método:** Estudo de coorte prospectiva, realizado no Hospital Universitário de Londrina, Paraná, Brasil, entre março de 2011 a dezembro de 2012. Foram acompanhados pacientes ≥ 18 anos, que apresentaram infecção por ERC. Dados demográficos e clínicos como idade, sexo, diagnóstico à admissão e presença de co-morbidades de acordo com critérios de Charlson, internação em Unidade de Terapia intensiva e scores APACHE e SOFA desses pacientes, colonização prévia por ERC, cirurgia prévia à infecção, diálise, uso prévio de antimicrobianos e sítio de infecção foram coletados. Foram avaliados os antimicrobianos utilizados para tratamento das infecções por mais de 48 horas nos seguintes pontos: monoterapia ou terapia associada, tempo de início (menor e maior que 12 horas). A identificação do agente foi realizada por método automatizado (Vitek II – bioMérieux^R) e a concentração inibitória mínima dos antibióticos por técnica de microdiluição em caldo, pesquisa de gene *bla*_{KPC} pela técnica de *Polimerase Chain Reaction* e sinergismo entre drogas utilizadas em tratamento combinado por meio do método *Time Kill*. A clonalidade, por *Pulsed Field gel eletroforese* e analisada por dendograma pelo Bionumerics. Foram realizadas análise bivariada e regressão logística multivariada com técnica de Forward Stepwise para detectar fatores de risco para resistência a polimixina e mortalidade. O nível de significância adotado foi de 5%, utilizando os programas Epi Info 7.0 e SPSS. **Resultados:** No período de estudo, 127 pacientes apresentaram infecções por ERC, idade média de 55,7 (± 18) anos e 88 (69.3%) do sexo masculino. Infecções de trato respiratório (52-42%) e trato urinário (51 – 40,2%) foram as mais frequentes, 27 (21,3%) resistentes à polimixina, 113 (89%) das enterobactérias eram *K. pneumoniae* e 96 (75,6%) tinham gene *bla*_{KPC}. Cinquenta e cinco (43,3%) eram polimicrobianas, a maioria (28,3%) co-infecção por *Acinetobacter baumannii*. A taxa de mortalidade hospitalar foi 61,4%, sendo 34,6% relacionada à infecção e não houve diferença significativa entre os grupos sensíveis (34%) e resistentes à polimixina (37%), $p=0.46$. Os fatores de risco independentes para óbito foram choque (OR 27.40; IC95% 1.68-446.82; $p= 0.02$) e diálise (OR 13.26; IC95% 1.17-149.98; $p= 0.03$); para resistência à polimixina: uso prévio de carbapenem (OR 2.95; IC95% 1.12-7.78; $p= 0.02$) e para óbito nessa população: diálise (OR 7,58; IC95% 1,30-43,92; $p= 0.02$). Terapia combinada, tempo de início de antibiótico sensível e sinergismo *in vitro* não tiveram impacto significativo na mortalidade. **Conclusão:** O uso prévio de carbapenêmico foi o único fator associado com a resistência à polimixina nesse estudo. Os fatores associados ao óbito entre os pacientes com infecções por enterobactérias resistentes à polimixina foram fatores de gravidade, como diálise e choque. Nenhuma

opção terapêutica, em especial a associação de drogas e nem o tempo de início do tratamento, interferiu na mortalidade deste grupo de pacientes.

Descritores: *Enterobacteriaceae*; Farmacorresistência bacteriana múltipla; Carbapenêmicos; Polimixinas.

Abstract

Carrilho, CMDM. *Clinical, microbiology and molecular characterization and treatment of infections with carbapenem-resistant Enterobacteriaceae* [Thesis] . São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2014

Introduction: Infections due to Carbapenem resistant *Enterobacteriaceae* (CRE), particularly *Klebsiella pneumoniae* producing carbapenemase type KPC, have been endemic in several regions around the world. Their treatment remains a major challenge, particularly for isolates resistant to polymyxin.

Objectives: To describe the clinical, microbiological and molecular characteristics of infections by CRE. **Methods:** Prospective cohort conducted at the University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil, from March 2011 to December 2012. All hospitalized patients ≥ 18 years old who developed infection by CRE were followed until death or discharge. We collected and analyzed the following clinical data: age, sex, diagnosis at admission, presence of comorbidities according to the Charlson criteria, admission in Intensive Care Unit, APACHE and SOFA scores, previous colonization by CRE, previous surgery, dialysis, prior antibiotic use and infection site; furthermore, we also evaluated the time between the blood culture collect and the first antimicrobial dose administration (start time - smaller or longer than 12 hours) as well as whether the treatment was monotherapy or combine therapy for more than 48 hours. The microbiological identification was performed by automated method (Vitek II - bioMerieux^R) and the minimum inhibitory concentration of antibiotics by broth microdilution technique, research *bla*_{KPC} gene by the technique of Polymerase Chain Reaction and synergism between the drugs used in the combination therapy by Time Kill method. The clonality was carried out by pulsed-field gel electrophoresis and analyzed by dendrogram by BioNumerics. Bivariate analyses and multivariate logistic regression with forward stepwise technique were performed to detect risk factors for resistance to polymyxin and mortality. The level of significance was 5%, using Epi Info 7.0 and SPSS programs. **Results:** During the study period, 127 patients developed infections by CRE, mean age 55.7 (± 18) years and 88 (69.3%) were male. Respiratory tract infections 52 (42%) and urinary tract 51 (40.2%) were the most frequent. Twenty seven (21.3%) agents were resistant to polymyxin; 113 (89%) were *K. pneumoniae* and 96 (75.6%) had *bla*_{KPC} gene. Fifty-five (43.3%) were polymicrobial, the majority (28.3%) co-infection by *Acinetobacter baumannii*. The hospital mortality rate was 61.4% and 34.6% of the death were related to infection. There was no difference in mortality rate between sensitive (34%) versus resistant (37%)($p = 0.46$) to polymyxin. The independent risk factors for death were shock (OR 27.40; 95% CI 1.68-446.82; $p = 0.02$) and dialysis (OR 13.26; 95% CI 1.17-149.98; $p = 0.03$); and for resistance to polymyxin were previous use of carbapenem (OR 2.95; 95% CI 1.12-7.78; $p = 0.02$). The risk factor for death in our study was dialysis (OR 7.58; 95% CI 1.30 to 43.92; $p = 0.02$). Combine therapy, start time and sensitive and antibiotic synergy in vitro had no significant impact on mortality. **Conclusion:** In our study, previous carbapenem use was the only factor associated with resistance to polymyxin. Furthermore, dialysis and shock were the only factors associated with death among patients with infections caused by CRE resistant to polymyxin. No therapeutic option, especially the combination of drugs and the start time decreased the higher mortality rates in this group of patients.

Descriptors: *Enterobacteriaceae*; Drug resistance, multiple, bacterial;
Carbapenems; Polymyxins

1. Introdução

Enterobactérias são microrganismos gram-negativos, comumente isoladas de materiais biológicos e também na natureza (água, solo e plantas), além do trato gastrointestinal de humanos e animais. As espécies de *Klebsiella* mais frequentemente associadas a doenças em humanos são a *K. pneumoniae* e *K. oxytoca*, consideradas patógenos oportunistas. Esses microrganismos estão entre os principais patógenos causadores de infecções em diferentes sítios, desde uma simples cistite até pneumonia, peritonite, bacteremia e meningite (Diekema *et al.*, 2007; Wisplinghoff *et al.*, 2004).

As enterobactérias constituem parte da microbiota normal do trato gastrointestinal (TGI) humano, o que torna os indivíduos potenciais reservatórios deste patógeno, podendo levar à transmissão via fecal-oral, na comunidade ou entre pacientes que vivem em unidades de longa permanência (Endimiani *et al.*, 2009). Como patógenos oportunistas, uma vez no TGI, esta colonização pode ser fator de risco para infecção, em especial para pacientes acima de 60 anos, do sexo feminino, com infecções urinárias de repetição, submetidos a procedimentos urinários invasivos, diabéticos ou com uso prévio de aminopenicilinas, cefalosporinas e quinolonas (Rodriguez-Bana *et al.*, 2008).

1.1 Epidemiologia

Nos últimos 25 anos a resistência antimicrobiana emergiu, cresceu, disseminou-se e dificultou imensamente o tratamento das infecções causadas por

patógenos hospitalares, em especial após o surgimento das enterobactérias produtoras de β -lactamases de espectro estendido, denominadas ESBL. Associado a isso, há um grande número de procedimentos invasivos, em especial nas Unidades de Terapia Intensiva (UTI), cujo ambiente é propício ao surgimento de patógenos multirresistentes (Martins, 2004).

No Brasil, as taxas de infecções causadas por microrganismos produtores de ESBL são muito altas, como citado no estudo de Marra *et al.*, 2006, onde 52% das cepas de *K. pneumoniae* isoladas de 118 infecções de corrente sanguínea entre 1996 e 2001 eram produtoras de ESBL. Alguns autores mostram que a mortalidade de pacientes com infecções por microrganismos produtores de ESBL é superior aos não produtores de ESBL (51% vs 29,8%; $p=0,08$), conforme estudo de Superti *et al.*, 2009,

Durante muitos anos, as drogas de escolha para tratamento de infecções por enterobactérias produtoras de ESBL foram os carbapenêmicos, o que levou ao aumento no consumo destes antimicrobianos (Queenan & Bush, 2007; Schwaber *et al.*, 2008). A exposição prévia a antimicrobianos e em especial carbapenêmicos, parece ter sido um dos fatores que levaram à resistência a essas drogas, em especial pela ação das carbapenemases, enzimas que hidrolisam os carbapenêmicos (Lee, 2012; Patel *et al.*, 2011).

A primeira descrição de *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase tipo KPC, ou seja *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, doravante denominada KPC, ocorreu em 2001, de um caso ocorrido em 1996, na Carolina do Norte, Estados Unidos (Yigit *et al.*, 2001). Desde então relatos de casos e surtos em vários países têm sido descritos, incluindo China, Brasil, França, Israel, Itália,

Índia, Colômbia, Argentina, Suíça, Finlândia, Noruega, Espanha, Coreia (Nordmann *et al.*, 2009; Adler & Carmeli, 2011). Esses relatos ocorrem em diferentes populações, desde ambientes hospitalares, pacientes de “home care”, unidades de cuidados agudos de longa permanência, transplantados e até na comunidade (Nordmann *et al.*, 2009; Endimiani *et al.* 2009; Bennett *et al.* , 2010; Hirsch *et al.*,2011; CDC, 2011). Atualmente, esses patógenos são considerados endêmicos em várias partes do mundo (Munoz-Price *et al.*, 2013).

Dentre as enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos, a *K. pneumoniae* é a espécie mais comum (Queenan & Bush, 2007). Em geral apresenta resistência a quase todos os antimicrobianos testados e está associada a altas taxas de mortalidade que variam de 14% a 70%, em especial entre pacientes debilitados, invadidos com dispositivos e com longo tempo de internação (CDC, 2009; Kontopoulou *et al.*, 2010; Capone *et al.*, 2013, Sbrana *et al.*, 2013).

Embora descrita inicialmente em *K. pneumoniae* e mais frequentemente identificada em enterobactérias, essa carbapenemase se disseminou e já foi descrita em gram-negativos não fermentadores, como *Pseudomonas* spp e *Acinetobacter* spp (Arnold *et al.*, 2011), demonstrando capacidade de rápida disseminação.

Infecções por enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos (ERC) são cada vez mais frequentes. Em 2007, dados do CDC, o *Centers for Disease Prevention and Control*, de Atlanta, USA, mostravam que 8% de todas as *K. pneumoniae* isoladas nos Estados Unidos eram resistentes aos carbapenêmicos, comparado com menos de 1% em 2000, Estas infecções estão associadas ao

aumento na permanência hospitalar, às falhas terapêuticas frequentes, a um custo elevado e morte (Hirsch & Tam, 2010; Neurer *et al.*, 2011).

Dados de mortalidade por ERC mostram taxas superiores a 50% (Carmeli *et al.*, 2010; Neurer *et al.*, 2011). A mortalidade devido a essas infecções permanece elevada e inaceitável, conforme recente revisão sobre tratamento de Tsouvelekis *et al.*, 2014, Agravando esse fato, surgem cada vez mais infecções por ERC com resistência às polimixinas (Antoniadou *et al.*, 2007; Mammina *et al.*, 2012, Capone *et al.*, 2013) com taxas de mortalidade superiores a 70% (Kontopoulou *et al.*, 2010), além das pan-resistentes (Elemam *et al.*, 2009, Endimiani *et al.*, 2010, Humphries *et al.*, 2010) também descritas.

1.2 Fatores de Risco

Os fatores de risco para infecção por ERC incluem: idade avançada, gravidade da doença de base, uso prévio de antimicrobianos, transplantes, ventilação mecânica e longa permanência hospitalar (CDC, 2009; Nadkarni *et al.*, 2009; Gasinsk *et al.*, 2009). O estudo de Patel *et al.*, 2008 demonstrou que transplante, uso de cateter venoso central, ventilação mecânica, longa permanência hospitalar, infecção prévia e uso de antimicrobianos beta-lactâmicos (cefalosporinas, inibidores de beta-lactamase e carbapenêmicos) foram fatores de risco para aquisição de *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos. A mortalidade hospitalar foi 48% e a associada à infecção por *K. pneumoniae*

resistente aos carbapenêmicos foi 38%. Permanência em UTI e dias cumulativos de uso de antibióticos também foram fatores de risco para aquisição de *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos no estudo de Lee *et al.*, 2013,

1.3 Mecanismo de resistência

A emergência e a disseminação de inúmeros microrganismos resistentes resultam da combinação de múltiplos fatores, tais como: mutações dos genes de resistência que aumentam seu espectro de atividade; troca de informações genéticas, quando os genes de resistência são transferidos para novos patógenos; pressão seletiva exercida pelas condições do meio que favorece a emergência e disseminação de microrganismos resistentes, como nos hospitais; proliferação e disseminação de clones multirresistentes, que podem ocorrer globalmente (Tenover, 2001).

Os diferentes tipos de mecanismos de resistência desenvolvidos pelos bacilos gram-negativos são alteração da permeabilidade da membrana externa, bomba de efluxo, alteração do sítio de ação da droga e produção de enzimas. A produção de enzimas inativadoras é o principal mecanismo descrito nas bactérias gram-negativas, por meio principalmente da produção de β -lactamases, enzimas que catalisam a hidrólise do anel β -lactâmico, inativando o antimicrobiano (Rossolini, 2005). Essas enzimas podem ser adquiridas por meio de genes codificadores específicos encontrados em plasmídeos ou outros elementos

genéticos móveis (Silva *et al.*, 2000). Alguns gêneros de bactérias gram-negativas apresentam expressão ou produção natural de β -lactamases mediadas por cromossomos como, por exemplo, a AmpC, ou β -lactamase induzível na presença de antimicrobiano. Essas enzimas são estruturalmente relacionadas com as proteínas ligadoras de penicilina e apresentam homologia em sua sequência (Jacoby, 2009).

As β -lactamases são atualmente classificadas de acordo com sua homologia na sequência de aminoácidos (classificação de Ambler) ou de acordo com sua preferência por determinado substrato (classificação de Bush) (Rasmussen & Bush, 1997). Segundo Bush, 2010, as beta-lactamases podem ser divididas em quatro grupos: carbapenemases, metalo- β -lactamases, oxacilinasas e β -lactamases de espectro estendido (tabela 1).

Tabela 1 - Nova classificação das β -lactamases, 2010.

Bush-Jacoby 2010	Classe Molecular	Substrato	Inibição AC ou Tazobactam EDTA	Enzimas
1	C	Cefalosporinas	Não	<i>E.coli</i> AmpC
1e	C	Cefalosporinas	Não	CMY-37
2 ^a	A	Penicilinas	Sim Não	PC-1
2b	A	Penicilinas/Cefalosporinas	Sim Não	TEM-1;SHV-1
2be	A	Cefalosporina Espectro ampliado	Sim Não	TEM-3;DHV-2; CTXM-15
2br	A	Penicilinas	Não	TEM-30
2ber	A	Cefalosporinas espectro ampliado	Não	TEM-50
2c	A	Carbenicilina	Sim Não	Carb-3
2ce	A	Carbenicilina/cefepima	Sim Não	RTG-4
2d	D	Cloxacilina	Variável	Oxa-1; Oxa-10
2de	D	Cefalosporinas espectro ampliado	Variável	Oxa-11; Oxa-15
2df	D	Carbapenêmico	Variável	Oxa-23, Oxa-58
2e	A	Cefalosporinas espectro ampliado	Sim Não	CepA
2f	A	Carbapenêmico	Variável	KPC, IMI-1, SME-1
3a	B (B1)	Carbapenêmico	Não Sim	IMP-1;VIM-1, IND-1
3b	B (B3) B (B2)	Carbapenêmico Carbapenêmico	Não Sim Não Sim	L1,GOB-1 CphA
NI	Desconhecido	Desconhecido	Desconhecido	Desconhecido

AC, Ácido Clavulânico; EDTA, Ácido etilenodiamino tetra-acético

A primeira β -lactamase foi descrita em 1940 por Abraham e Chain antes mesmo do uso da penicilina para o tratamento de infecções bacterianas (Bush, 1989). Desde então, inúmeras β -lactamases foram identificadas e vários esquemas de classificação foram propostos para agrupar estas enzimas de acordo com suas características bioquímicas e pela análise de suas estruturas moleculares (Bush, 1989, 2010; Bush *et al.*, 1995; Livermore, 1995).

As β -lactamases foram divididas de acordo com suas estruturas primárias em quatro classes (A a D), segundo Ambler (1980). E, de acordo com as diferenças em seus mecanismos catalíticos, estas classes ainda podem ser classificadas dentro de dois grupos: serina- β -lactamases (classes A, C e D) e metalo- β -lactamases (classe B) (Ambler, 1980; Bush *et al.*, 1995).

As carbapenemases do grupo A incluem membros designados SME, IMI, NMC, GES e a família das KPCs. Estas possuem em seu sítio alvo um grupamento serino. Já a classe D de carbapenemases consiste no grupo OXA, frequentemente descrita em *Acinetobacter baumannii* e a classe B são constituídas por metalo- β -lactamase (IMP, VIM, SIM, SPM, GIM) (Livermore, 2002), em cujo sítio ativo há um átomo de zinco e foi identificada primeiramente em *Pseudomonas aeruginosa* (Queenan & Bush, 2007).

Até o momento, a metalo- β -lactamase tipo SPM foi encontrada somente no Brasil (Doi *et al.*, 2007) e mais recentemente a NDM-1 (*bla*_{NDM-1}) foi descrita no Rio Grande do Sul, encontrada em *Enterobacter cloacae* e *Providencia rettgeri*, após já ter sido descrita em outros países desde 2008 (ANVISA, 2013). As metalo β -lactamases, por utilizarem zinco no sítio ativo, são inativadas in vitro por EDTA, um quelante de zinco. (Queenan & Bush, 2007).

Os genes que codificam essas enzimas são carregados por plasmídeos, que além de determinarem a resistência aos antimicrobianos, podem também transmitir genes de virulência. Devido às características de transmissão de um plasmídeo, os genes de resistência são também facilmente disseminados entre gêneros e espécies diferentes, resultando em surtos causados por patógenos mais virulentos e resistentes. KPC e metalo β -lactamase VIM são as β -lactamases mais frequentes descritas (Queenan & Bush 2007).

A produção de múltiplas β -lactamases em um único patógeno gram-negativo está aumentando. Isolados de espécies de *Klebsiella* produtoras de KPC-2, SHV (ESBL) e TEM-30 têm sido reportadas como endêmicas nos EUA (Bradford *et al.*, 2004; Bratu *et al.*, 2005; Hanson *et al.*, 1990).

Outro importante mecanismo de resistência aos carbapenêmicos descrito nas enterobactérias é a alteração das proteínas da membrana externa. Nos gram-negativos, a membrana externa é a primeira barreira contra a entrada de compostos tóxicos. Essa camada é composta externamente por lipopolissacarídeos e a face interna por fosfolipídios. Moléculas de proteínas de estrutura trimérica cruzam a estrutura interna da membrana externa; essas proteínas, denominadas proteínas de membrana externa (OMPs) ou porinas, formam canais de transporte que permitem a difusão de substâncias hidrofílicas e pequenos nutrientes, podendo esse transporte ser seletivo ou não seletivo (Vila *et al.*, 2007).

Muitos antibióticos, inclusive os carbapenêmicos, usam esses canais para acessar o periplasma. A entrada dos antibióticos através da membrana externa

depende das propriedades das OMPs (número e tamanho) e das características físico-químicas desses antibióticos (Ishi & Nakae, 1993).

O mecanismo de efluxo é expresso em todas as células com a função de protegê-las de componentes tóxicos. O aumento da expressão desse mecanismo tem sido associado a bactérias multirresistentes (Vila *et al.*, 2007). O sistema de expulsão necessita de gasto de energia pela bactéria, porém, não ocasiona nenhuma alteração ou degradação da droga (Kumar *et al.*, 2005). Nos últimos anos a bomba de efluxo mostrou-se associada à resistência a várias classes de antimicrobianos como descrito anteriormente, porém, é controversa a resistência aos carbapenêmicos por meio dessa bomba. Esse mecanismo de resistência é mais frequente entre os bacilos gram-negativos não fermentadores (Tam *et al.*, 2007, Coyne *et al.*, 2011).

1.4 Tratamento

As opções terapêuticas são limitadas, com relatos de sensibilidade *in vitro* aos aminoglicosídeos, polimixinas, tigeciclina e fosfomicina (Souli *et al.*, 2009; Grundmann *et al.*, 2010), entretanto sem estudos clínicos controlados.

Apesar de essas drogas serem bastante utilizadas há muito tempo, seu uso nas infecções por enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos apresentam uma série de restrições, como a falta de padronização de teste de sensibilidade; uma vez que não há um ponto de corte definido na literatura e tampouco um método padrão-ouro (CLSI, 2013; Eucast, 2013). Outra dificuldade é a definição de dose e

intervalo adequados, necessidade ou não de dose de ataque e questões relacionadas à farmacocinética. É o caso, por exemplo, da colistina, que é uma pró-droga e apresenta diferenças de pK/pD entre a droga ativa (colistina base) e o colistimetato (Dalfino *et al.*, 2012; Sandri *et al.*, 2013, Petrosillo *et al.*, 2013).

As polimixinas são drogas utilizadas desde 1960, com amplo espectro de ação contra bacilos gram-negativos. Tornaram-se obsoletas devido a sua nefrotoxicidade e neurotoxicidade (Li *et al.*, 2005), após o surgimento de drogas ativas menos tóxicas. Voltaram a ser utilizadas em grande escala com o surgimento da resistência das *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* (Arruda *et al.*, 1999, Levin *et al.*, 1999) e mais recentemente, das enterobactérias aos carbapenêmicos. Essas drogas interagem com o lipídio A causando desorganização da membrana externa (Hancock, 1997). Contudo, já existem relatos de heterorresistência a polimixina E (colistina) (Li *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2009), além da resistência as polimixinas por *Acinetobacter baumannii* (Hawley *et al.*, 2008; Tan *et al.*, 2007).

A resistência dos gram-negativos à polimixina na Grécia aumentou de 0% em 2007 a 24,3% em 2009, atribuindo importante papel à heterorresistência (Kantopolou *et al.*, 2010; Zarkotou *et al.*, 2010). Estudo de Meletis *et al.*, 2011, demonstrou heterorresistência em isolados de pacientes pós uso de colistina, mas também sem o uso prévio da colistina. Apesar das altas taxas de resistência, as polimixinas permanecem como a opção mais viável para o tratamento de infecções por gram-negativos resistentes aos carbapenêmicos e, em geral, requerem dose de ataque (Nation *et al.*, 2010).

A fosfomicina é um antimicrobiano de largo-espectro, bactericida, tempo-dependente que atua na síntese da parede bacteriana. Possui atividade contra várias cepas de *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos, à tigeciclina e à colistina. Inicialmente utilizada em formulações orais para tratamento de infecções de trato urinário, a apresentação intravenosa é disponível apenas no Japão e alguns países da Europa. Apresenta alta concentração em urina, plasma, pulmão, liquor e baixa nefrotoxicidade. É descrita resistência a fosfomicina quando utilizada como monoterapia (Falagas *et al.*, 2010; Florent *et al.*, 2011). Os estudos que utilizaram fosfomicina no tratamento de gram-negativos, entretanto, são com pequeno número de casos e, em geral, a fosfomicina foi associada à polimixina, gentamicina ou outra, desde que sensível *in vitro*. É uma droga que pode ser considerada como opção no tratamento de infecções por enterobactérias resistentes, com um bom perfil de sensibilidade e de segurança, inclusive contra cepas resistentes à colistina e tigeciclina, porém ainda não há padronização de dose e corte para Concentração Inibitória Mínima (CIM) (Michalopoulos *et al.*, 2010; Endimiani *et al.*, 2010; Perdigão-Neto *et al.*, 2014).

A tigeciclina, uma glicilciclina com ação contra várias enterobactérias, inclusive produtoras de ESBL e KPC, com excelente sensibilidade *in vitro*, também apresenta falhas terapêuticas (Castanheira *et al.*, 2008). O mecanismo de ação é na síntese protéica, inibindo a fração 30s do ribossomo. O FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou o ponto de corte de sensibilidade com CIM de 2 µg/mL, e Eucast <1µg/mL. Suas indicações também são restritas, como infecções de pele e partes moles, intra-abdominais graves e pneumonia comunitária. Não há boa concentração urinária, assim como o nível serico é errático, não havendo,

portanto, indicações para estas infecções. Uma estratégia, relatada em alguns estudos, tem sido o uso de dose dobrada nas infecções graves de corrente sanguínea e pulmão (Humphries *et al.*, 2010).

O uso de carbapenêmicos no tratamento de infecções por enterobactérias resistentes a essas drogas também tem sido descrito, em especial quando a CIM dessa droga é $\leq 4\mu\text{g /mL}$, em altas doses e com infusão prolongada, associado com outras drogas ativas, como colistina, tigeciclina ou amicacina (Daikos *et al.*, 2011). Entretanto, em situações com CIMs maiores do que $4\mu\text{g /mL}$, quando associado a outras drogas, tem sido utilizado e com resultados benéficos (Tumbarello *et al.*, 2012). Recentemente foram publicados estudos de casos que utilizaram dois carbapenêmicos na tentativa de tratar infecções por enterobactérias pan-resistentes (Bulik *et al.*, 2011, Giamarellou *et al.*, 2013, Ceccarelli *et al.*, 2013).

Quanto aos aminoglicosídeos, também inibem a síntese protéica, ligando-se a fração 30s do ribossomo. Demonstram ação *in vitro* contra as enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos (Endimiani *et al.*, 2009). Inicialmente utilizado contra gram-negativos, possuem atividade concentração-dependente e longo efeito pós-antibiótico. Apresentam boa distribuição em osso, peritônio e urina, entretanto, baixa penetração em liquor e próstata. Frequentemente fazem parte de associações de antimicrobianos. A nefrotoxicidade é um dos mais temidos efeitos colaterais, indicando a monitorização de seus níveis séricos (van Duin *et al.*, 2013).

Portanto, a única droga efetiva com possibilidade de tratar infecções pulmonares, urinárias e da corrente sanguínea parece ser a polimixina.

Entretanto, deve ser levada em consideração, além da toxicidade já descrita, a escassez de estudos com essa droga no tratamento de infecções por ERC e relatos de resistência destes patógenos à polimixina durante o seu uso (Lee & Jenkins, 2009).

Estudos sobre a dose ótima de colistina, em função da diferença farmacocinética entre a colistina base e o metanosulfato, além da necessidade de dose de ataque, têm sido publicados nos dois últimos anos (Garonzik *et al.*, 2011; Mohamed *et al.*, 2012). Associações com rifampicina ou outras drogas também têm sido descritas (Bratu *et al.*, 2005, Poudyal *et al.*, 2008).

Apresentamos a seguir uma revisão com os principais estudos sobre tratamento das infecções por enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos nos últimos 5 anos:

Tabela 2 - Revisão dos principais estudos sobre tratamento de infecções por ERC nos últimos 5 anos

Autor, ano	Design do estudo	População abrangida	Objetivo, desfecho primário	Microrganismos envolvidos	Recomendações ou conclusões
Michalopoulos <i>et al.</i> , 2010	Prospectivo	n = 11 • Bacteremia = 2 • PAV + bacteremia = 3 • ITU + bacteremia = 2 • ITU = 2 • ISC + bacteremia = 1 • ISC = 1	1- Mortalidade intra-hospitalar global 2- Desfecho clínico e microbiológico 3- Efeitos adversos da fosfomicina	<i>K. pneumoniae</i> resistente aos carbapenêmicos e sensíveis à fosfomicina	<ul style="list-style-type: none"> Mortalidade global = 18,2% Não foram observados efeitos adversos Combinações de tratamentos: <ul style="list-style-type: none"> Fosfomicina + colistina = 6 Fosfomicina + gentamicina = 3 Fosfomicina + piperacilina/tazobactam = 1 “Todos os pacientes tiveram desfechos clínicos e microbiológicos satisfatórios” não há análise adicional
Zarkotou <i>et al.</i> , 2010	Caso-controle (1:3)	Casos = 13 (2 previamente colonizados por ERC e receberam colistina) Controles = 39	Fatores de risco envolvidos na aquisição de <i>K. pneumoniae</i> resistente a polimixinas Impacto no desfecho do paciente	<i>K. pneumoniae</i> resistente aos carbapenêmicos <i>K. pneumoniae</i> resistente à polimixina	Fatores de risco: Univariada: <ul style="list-style-type: none"> Admissão de outras instituições ($p = 0,019$) Tempo de exposição à b-lactâmicos/inibidores b-lactamases ($p = 0,002$) Multivariada: <ul style="list-style-type: none"> Nenhum Impacto: <ul style="list-style-type: none"> Aumento na mortalidade global (69,2% vs 35,9%; $p = 0,05$)
Neuner <i>et al.</i> , 2011	Estudo retrospectivo de revisão de prontuários	n = 51 • IPCS = 55% • ITU = 14% • Pneumonia = 12% • Abdominal = 12%	Descrever o tratamento e o desfecho destes pacientes	Bacteremia por <i>K. pneumoniae</i> resistente aos carbapenêmicos	<ul style="list-style-type: none"> Mortalidade global = 51% Mortalidade em 14 dias = 31% Média de tempo entre hemocultura positiva e óbito = 9 dias Re-admissão em 90 dias = 72% Sem diferença estatística com os diferentes regimes de tratamento Score de bacteremia de Pitt foi maior nos não sobreviventes (OR = 1,33 [1,02 – 1,75] $p=0,039$)
Bulik <i>et al.</i> , 2011	Ensaio pré clínico • <i>In vitro</i> • <i>In vivo</i> (modelo murino)	--	Demonstrar maior eficácia da combinação de dois carbapenêmicos vs monoterapia com carbapenêmicos	<i>K. pneumoniae</i> KPC354 (KPC -3) • CIM doripenem = 4 • CIM ertapenem = 64	Curva de morte bacteriana é melhor na associação ertapenem 1g q 24h + doripenem 2g q 8h (redução de 3-log sustentada por 16h)
Satlin <i>et al.</i> , 2011	Coorte retrospectiva	87 casos de bacteriúria com instituição de tratamento (polimixina = 25, aminoglicosídeos = 41, tigeciclina = 21) 69 controles com bacteriúria não tratados	PRIMÁRIO: Comparar as taxas de clearance microbiológico de diferentes drogas SECUNDÁRIO: <ul style="list-style-type: none"> Bacteremia Desenvolvimento de resistência à droga utilizada para tratamento Nefrotoxicidade Mortalidade global Mortalidade em 30 dias 	Urocultura com <i>K. pneumoniae</i> resistente aos carbapenêmicos $> 10^4$ UFC/mL	Taxa de clearance em urocultura de controle: <ul style="list-style-type: none"> Aminoglicosídeos (AG) = 88% Poli B = 64% ($p = 0,02$ comparado com AG) Tige = 43% ($p < 0,001$ comparado com AG) Sem tratamento = 36% ($p < 0,001$ comparado com AG) Secundário: <ul style="list-style-type: none"> Bacteremia em 30 dias = 6% (sem diferença entre os grupos) Desenvolvimento de resistência à droga utilizada para tratamento = sem diferença entre os grupos Mortalidade global = 16% (sem diferença entre os grupos) Nefrotoxicidade = 16% (AG = 13%; Poli B = 37%; Tige = 0%) $p = 0,004$

Qureshi <i>et al.</i> , 2012	Coorte observacional retrospectiva 2 centros (EUA)	n = 41 • IPCS = 6 • Pneumonia = 10 • ITU = 7 • Cateter = 13	Demonstrar superioridade da terapia combinada para bacteremia por <i>K. pneumoniae</i> CR.	<i>K. pneumoniae</i> resistente aos carbapenêmicos em bacteremia primária ou secundária • KPC -2 = 21 • KPC -3 = 20	<ul style="list-style-type: none"> Mortalidade em 28 dias = 39%; Bacteremia secundária à pneumonia tem maior mortalidade (OR = 5,7 [0,98 – 3,68], p = 0,03) Terapia combina é fator protetor (OR = 0,13 [0,01 – 0,082], p = 0,01) na análise univariada e na multivariada (OR = 0,07 [0,009 – 0,71], p = 0,02)
Tamma <i>et al.</i> 2012	Revisão da literatura	8 trabalhos envolvendo MDR BGN (4 prospectivos, sendo 3 observacionais e 1 randomizado e 4 retrospectivos)	Avaliar o desfecho clínico, comparando monoterapias terapia combinada para infecções por BGN	BGN	5 trabalhos não demonstraram diferença entre monoterapia e terapia combinada (diversas combinações) 3 trabalhos demonstraram vantagem em combinar (carbapenêmicos + colistina ou aminoglicosídeo; tigeciclina com aminoglicosídeo melhor que monoterapia com tigeciclina; combinação de polimixina B e tigeciclina previne a emergência de resistência quando comparado a polimixinamonoterapia)
Tumbarello <i>et al.</i> , 2012	Coorte retrospectiva observacional 3 hospitais universitários italianos	n = 125	Mortalidade em 30 dias. Estabelecer os preditores de mortalidade.	<i>K. pneumoniae</i> resistente aos carbapenêmicos em bacteremia • KPC -2 = 21,6% • KPC -3 = 78,4%	<ul style="list-style-type: none"> Taxa de mortalidade = 41,6% 3 fatores independentes de mau prognóstico: <ul style="list-style-type: none"> Choque séptico (OR = 7,17 [1,65 – 31,03, p = 0,008]) APACHE III (OR = 1,04 [1,02 – 1,07], p < 0,001) Terapia empírica inapropriada (OR = 4,17 [1,61 – 10,76], p = 0,003) O acréscimo de meropenem ao regime aumentou a sobrevida em 87,5% dos pacientes Esquema mais protetor: tigeciclina + colistina + meropenem (OR = 0,11 [0,02 – 0,69], p = 0,01)
Neuner <i>et al.</i> , 2012	Estudo transversal de revisão de prontuários	n = 41 pacientes (44 episódios de ITU tratados com fosfomicina)	Descrever o desfecho clínico, microbiológico e fatores de risco envolvidos em pacientes com ITU por microrganismo MDR tratados com fosfomicina.	Microrganismo MDR • 13 <i>K. Pneumoniae</i> resistente aos carbapenêmicos • 8 <i>Pseudomonas</i> resistente aos carbapenêmicos • 7 VRE • 7 produtores de ESBL • 9 outros	Susceptibilidade global <i>in vitro</i> 86%, cura microbiológica 59% Susceptibilidade <i>in vitro</i> da KP CR 92%, cura microbiológica 46% Desenvolvimento de resistência a fosfomicina durante o tratamento = 3 pacientes (todos com KP CR e em associação com tigeciclina) 2 pacientes tiveram superinfecção por KP CR em 30 dias.
van Duin <i>et al.</i> , 2013	Revisão da literatura	--	Descrever as drogas disponíveis para o tratamento, revisar o desfecho ICS e ITU.	ERC	ICS: terapia combinada com duas ou três drogas ITU: Evitar tigeciclina. Melhor clearance microbiológico com aminoglicosídeo. Fosfomicina parece uma boa alternativa, mas carece de dados clínicos.
Zavascki <i>et al.</i> , 2013	Revisão da literatura	--	Sumarizar as evidências em utilizar terapia combinada	BGN resistente aos carbapenêmicos	Por que combinar? <ul style="list-style-type: none"> Maximizar a taxa e extensão de morte bacteriana Prevenir recaída e desenvolvimento de resistência Pontos altos: <ul style="list-style-type: none"> Otimizar a prescrição de antimicrobianos (dose, intervalo e tempo de infusão) Propõe fluxograma para auxiliar na escolha da combinação de drogas

Giamarellou <i>et al.</i> , 2013	Relato de casos	n = 3 • 2 sepses urinárias • 1 bacteriúria assintomática	Relatar 3 casos de tratamento com a proposta de Bulik e Nicolau (duplo carbapenêmico)	<i>K. pneumoniae</i> KPC – 2	3 casos de sucesso com a terapia instituída sem recaída com acompanhamento de 10 meses, 3 semanas e 6 meses, respectivamente.
Evren <i>et al.</i> , 2013	Ensaio pré-clínico (microbiológico)	12 cepas de 10 pacientes	Avaliar o sinergismo <i>in vitro</i> da fosfomicina	<i>K. pneumoniae</i> produtoras de OXA-48	Resultados: • Fosfomicina + imipenem = 42% de sinergismo • Fosfomicina + meropenem = 33% de sinergismo • Fosfomicina + colistina = 100% de antagonismo • Fosfomicina + tigeciclina = 33% de sinergismo
Dubrovskaya <i>et al.</i> , 2013	Estudo retrospectivo de revisão de prontuários	n = 40 • ICS primária e secundária = 45% • ITU = 30% • Pneumonia = 17,5% • IPPM = 10% • Abdominal = 5% • Osteomielite = 2,5%	Descrever o desfecho de pacientes com infecção por <i>K. pneumoniae</i> resistente aos carbapenêmicos tratados com polimixina B em monoterapia	<i>Klebsiella pneumoniae</i> resistente aos carbapenêmicos (Resistência à tigeciclina = 60%)	• Taxa de sucesso terapêutico com Polimixina B em monoterapia = 73% ○ Mortalidade em pneumonia = 43% • Mortalidade em 30 dias = 18% • Nefrotoxicidade = 10%
Crusio <i>et al.</i> , 2013	Estudo de coorte observacional (Polimixina B era corrigida para disfunção renal)	n = 104	Estudar os fatores de risco, desfecho e toxicidade de terapia combinada com polimixina B	Bacilo gram-negativo resistente aos carbapenêmicos • <i>Acinetobacter baumannii</i> = 33% • <i>Klebsiella pneumoniae</i> = 24% • <i>Pseudomonas aeruginosa</i> = 11%	• Todas as infecções foram fortemente associadas ao uso prévio de antimicrobianos e exposição a serviços de saúde • Mortalidade global intra-hospitalar = 47% • Mortalidade em 6 meses = 77% • Mortalidade em infecções por <i>Klebsiella pneumoniae</i> foi menor (24% vs 50%; p = 0,03) • Fatores de risco identificados para falha terapêutica: ○ Escore de doença aguda (OR = 2,2; p < 0,001) ○ Idade (OR = 10,4; p = 0,04) • Fatores de risco identificados para mortalidade hospitalar ○ Escore de doença aguda (OR = 2,2; p < 0,001) ○ Escore de Charlson (OR = 1,2; p = 0,04) • Insuficiência renal = 14,4% • Sem diferença significativa nos diferentes regimes terapêuticos (poli B + carba; poli B + carba + rifa; poli B + ampi/sulb; poli B + tige) • Adição de rifampicina não demonstrou benefício.
Kontopidou <i>et al.</i> , 2014	Estudo transversal multicêntrico com dados retrospectivos (52,8%) e prospectivos (47,2%)	19 UTIs 127 infecções microbiologicamente documentadas Topografias: Pneumonia, ICS, ITU, ISC, intra-abdominal.	Investigar as características dos pacientes envolvidos em infecções por <i>K. pneumoniae</i> CR e o desfecho em relação à terapia antimicrobiana recebida	<i>Klebsiella pneumoniae</i> resistente aos carbapenêmicos • KPC = 56,5% • VIM = 23,9% KPC e VIM = 6,5%	Melhores resultados: • Terapia combinada • Terapia à base de colistina • Idade < 55 anos • Sem imunossupressão Alertas: • Falha terapêutica com regimes a base de tigeciclina (terapia combinada ou monoterapia) • 20% resistência à colistina

Falagas <i>et al.</i> , 2014	Revisão sistemática da literatura	20 estudos 692 pacientes	Avaliar o tratamento, mortalidade	ERC (qualquer mecanismo)	<p>Resultado:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Monoterapia: colistina = até 57%; tigeciclina = até 80% • Combinações: tigeciclina+gentamicina = até 50%; tigeciclina + colistina = até 64%; colistina + carbapenêmico = até 67% <p>Limitações: Somente estudos não randomizados, a maioria retrospectivos.</p> <p>Conclusão: "terapia combinada pode oferecer vantagem em relação à mortalidade em pacientes críticos com infecções por ERC".</p>
Daikos <i>et al.</i> , 2014	Observacional retrospectivos em 2 centros gregos	<p>n = 205</p> <p>ICS primária e secundária</p> <ul style="list-style-type: none"> • 100% IRAS • Hospital A = 2,8/10000 pacientes-dia • Hospital B = 1,2/10000 pacientes-dia 	Fatores associados à mortalidade com ênfase em tratamento	<p><i>K. pneumoniae</i> produtora de carbapenemase</p> <ul style="list-style-type: none"> • KPC -2 = 61,9% • KPC-2 + VIM – 1 = 17,5% • VIM – 2 = 20,5% 	<ul style="list-style-type: none"> • Mortalidade global em 28 dias = 40% • Resistência à tigeciclina = 15,1% • Resistência à colistina = 25,4% • Mortalidade em monoterapia maior que em terapia combinada (44,4% vs 27,2%; p = 0,018) • Quanto maior a severidade da sepse, maior o impacto positivo na terapia combinada • Sugere melhor performance com tratamento à base de carbapenêmicos, especialmente quando CIM_≤8, porém não explora estes dados estatisticamente

CR: Carbapenem-resistente; ITU, infecção de trato urinário; PAV, pneumonia associada à ventilação mecânica; ICS, infecção de corrente sanguínea; ISC, infecção de sítio cirúrgico; ERC, enterobactéria resistente aos carbapenêmicos; KPC, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase; IPPM, infecção de pele e partes moles; IPCS, infecção primária de corrente sanguínea; MDR, multidroga resistente, BGN, bacilo gram-negativo, OR, odds ratio, RR, risco relativo; IRAS, infecção relacionada à assistência a saúde; APACHE, Acute physiology and chronic evaluation; KP, *Klebsiella pneumoniae*; VRE, enterococo resistente à vancomicina; CIM, concentração inibitória mínima; AG, aminoglicosídeo; Poli B, polimixina B, carba, carbapenêmico; tige, tigeciclina; ampi-sulb, ampicilina-sulbactam; rifa, rifampicina

1.5 Prevenção e controle

A resistência antimicrobiana dissemina-se numa velocidade cada vez maior, sendo hoje a principal preocupação na escolha do tratamento em pacientes hospitalizados. Até então, um problema que acometia principalmente pacientes críticos, a resistência bacteriana disseminou-se para além das unidades de terapia intensiva e chegou à comunidade. Esse fenômeno ficou bem caracterizado com as enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos, que rapidamente disseminaram por todo o mundo (Bratu *et al.*, 2005), mas também com outros patógenos problemáticos, como *S. aureus* resistente à oxacilina (MRSA), o enterococo resistente à vancomicina (VRE), as enterobactérias produtoras de β -lactamases de espectro ampliado (ESBL), beta-lactamase induzíveis (AmpC) e os gram-negativos não fermentadores resistentes aos carbapenêmicos.

Geralmente quando ocorre a disseminação da resistência, as medidas de prevenção e controle ou não foram adotadas a tempo ou não houve adesão a elas. Não obstante, há relatos de sucesso na contenção de disseminação de *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos com medidas básicas de prevenção, como a higienização das mãos e do ambiente associadas à vigilância com *swabs* retal (Kochar *et al.*, 2009).

Um importante estudo sobre contenção de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos foi publicado por Schwaber e colaboradores, em 2011, que implementaram uma intervenção coordenada pelo governo com objetivo de

tentar conter um grande surto iniciado em 2006 em 27 hospitais de Israel, que não conseguiram controle com medidas locais, atingindo 55,5 casos novos por 100,000 pacientes-dia. A intervenção ocorreu em 2007 e 2008 e no período pós-intervenção a densidade de incidência ficou abaixo de 20 novos casos por 100,000 pacientes-dia. As ações foram divididas em 3 estratégias: 1- precaução de contato e separação dos pacientes colonizados/infectados através de coorte, 2- enfermagem exclusiva aos pacientes isolados e 3- criação de força-tarefa sobre controle de infecção e resistência bacteriana. Esta força-tarefa tinha autonomia para coletar dados dos hospitais e intervir se necessário. Houve adesão quase universal às recomendações de precauções de contato, uso de luvas e aventais, além da separação física dos colonizados/infectados, embora não tenha havido adesão total ao profissional exclusivo de enfermagem no cuidado aos pacientes colonizados ou infectados. Houve redução de 55,5 casos por 100,000 paciente-dia para 11,7 casos por 100,000 paciente-dia ($p < 0,001$). Esse estudo demonstrou a importância de um planejamento estratégico com visão nacional no controle da disseminação da resistência bacteriana (Schwaber *et al.*, 2011).

Em 2009, o *Center for Diseases Control* (CDC) publicou no MMWR um guia de controle de infecções por enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos ou KPC em unidades de cuidados agudos (CDC, 2009). Esse guia norteou as medidas de prevenção e controle destes patógenos, juntamente com as recomendações do *Guia de Precauções de Isolamento* do CDC de 2007 (Siegel *et al.*, 2007). Em 2012, o mesmo órgão atualizou as medidas, com uma nova publicação (CDC, Toolkit, 2012). Em todas as publicações, o cerne da prevenção foi intensificar a higienização das mãos,

limpeza e desinfecção do ambiente, uso das precauções de contato, coorte de pacientes colonizados ou infectados, pesquisa de portadores em grupos de risco, como contatos com enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos; hospitalizados recentes, usuários de antimicrobianos, e pesquisa através de *swabs* retais.

Há relatos de coorte de *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos juntamente com outros patógenos resistentes (VRE, MRSA, *Pseudomonas* e *Acinetobacter* resistentes aos carbapenêmicos) numa mesma UTI, com ótimo controle da disseminação, desde que as demais medidas de controle de infecção e pesquisas por meio de *swabs* sejam intensificadas (Kochar *et al.*, 2009).

No Brasil, a primeira publicação da ANVISA sobre prevenção e controle de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos é de outubro de 2010 e desde então novas publicações pelo mesmo órgão têm ocorrido em função do surgimento de outra carbapenemase em *K. pneumoniae*, a *New Dheli* Metalobetalactamase ou NDM, no Rio Grande do Sul (Anvisa, 2010, 2013).

O real impacto de cada medida é difícil de ser avaliado já que as mesmas foram implantadas na forma de pacotes de medidas. Apesar das publicações, a dificuldade de se estabelecer e fazer cumprir efetivamente as medidas, com adesão de toda equipe de profissionais parece ser algo ainda distante em muitos serviços.

1.6 Enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos no Brasil

Em 2006 foram isolados os primeiros quatro casos de *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos em uma UTI de Recife, PE, de sítios urinário e sanguíneo. Foi confirmada a presença do gene *bla_{KPC2}* (Monteiro *et al.*, 2009).

Diversos relatos de casos ou surtos foram descritos no Brasil, inclusive em populações de pacientes transplantados (Zavascki *et al.*, 2009; Bergamasco *et al.*, 2012; Fehlberg *et al.*, 2012 Correa *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2013; Almeida *et al.*, 2013; Ribeiro *et al.*, 2013; Chang *et al.*, 2013).

Em fevereiro de 2009 foi detectado o primeiro caso de infecção por *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase no Hospital Universitário de Londrina (HUL), em um paciente proveniente de Goiás. Após a detecção, o paciente foi isolado com precaução de contato, foram colhidos *swabs* de todos os contatos e também colocados em precaução de contato (CDC, 2009). Entretanto, um dos contatos havia sido transferido para a UTI e, neste setor, entre fevereiro e abril de 2009, 19 pacientes foram colonizados ou infectados por *K. pneumoniae* resistente a carbapenêmicos, produtora de KPC. Apesar das medidas instituídas e do breve controle, a partir de junho de 2009 a *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos tornou-se endêmica no hospital, surgindo inclusive em unidade neonatal e sendo responsável tanto por infecções como colonizações. Há relatos também do surgimento de *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase em outros hospitais de grande porte na cidade. No Hospital Universitário, a densidade de incidência por 1,000

pacientes-dia de infecções e colonizações e mortalidade por ERC na Unidade de Terapia Intensiva, de fevereiro de 2009 a dezembro de 2013, são apresentadas no gráfico 1,

Gráfico 1- Densidade de incidência (por 1,000 paciente-dia) de infecção e colonização por ERC e mortalidade *semestral* de pacientes internados em UTIs, de fevereiro de 2009 a dezembro de 2013.

FONTE: CCIH/HU-UEL

Em 2010 ocorreu o primeiro relato de *Pseudomonas aeruginosa* produtora de KPC (*bla_{KPC}*) no Brasil, em 2 pacientes numa UTI de Recife, PE (Jácome *et al.*, 2012). Como é possível verificar, os genes de resistência comuns às enterobactérias parecem estar disseminando-se entre os bacilos gram-negativos não fermentadores, inclusive com múltiplos genes de resistência (Rizek *et al.*, 2014)

Em 2013 ocorreu em Porto Alegre, RS o primeiro surto por enterobactérias com mecanismo de resistência NDM-1 (*New Delhi* Metallo-betalactamase) ou *bla*_{NDM}, que colonizou seis pacientes, todos confirmados laboratorialmente. Os casos confirmados possuíam mediana de idade de 67 anos (50-73), todos eram portadores de doenças de base graves e comorbidades. Foi confirmada a colonização pelos microrganismos *Enterobacter cloacae* e *Providencia rettigeri* portadores do gene *bla*_{NDM-1} (ANVISA, 2013).

1.7 Justificativa

Justifica-se então este estudo pela falta de trabalhos prospectivos sobre o tratamento das infecções por enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos em um hospital onde esses agentes tornaram-se endêmicos.

2. Objetivos

2.1 Primário

Descrever as características clínicas, microbiológicas e moleculares das infecções por ERC, a mortalidade hospitalar e relacionada à infecção.

2.2 Secundários

- Descrever fatores de risco associados à mortalidade relacionada às infecções por ERC
- Descrever os fatores de risco associados com resistência à polimixina
- Descrever os fatores de risco para óbito entre os pacientes com infecções por ERC resistentes à polimixina
- Caracterizar a presença de carbapenemase e a clonalidade de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos isoladas de materiais clínicos
- Avaliar os esquemas terapêuticos utilizados e sinergismo *in vitro* dos antibióticos utilizados no tratamento dos diferentes clones nas infecções por ERC resistentes à polimixina

3. Material e Métodos

3.1 Características do Hospital

O Hospital Universitário de Londrina (HUL) é um órgão suplementar da Universidade Estadual de Londrina que se dedica ao ensino, pesquisa e extensão de serviços à comunidade, através da prestação de atendimento universal à população em todas as especialidades médicas pelo Sistema Único de Saúde (SUS). É o maior hospital público da região norte do Paraná, com 317 leitos, possui atendimento de pronto-socorro, unidades de internação médico-cirúrgica, unidades de terapia intensiva adulto (17 leitos), neonatal (10 leitos) e pediátrica (7 leitos), obstetrícia de alto risco, unidade de tratamento de queimados (6 leitos de UTI, 12 leitos de enfermaria), transplante de medula óssea (4 leitos com filtro HEPA) e ambulatórios.

3.2 Delineamento do Estudo

Estudo de coorte prospectiva realizado entre março de 2011 a dezembro de 2012.

3.3 População do estudo

Pacientes adultos com infecção documentada por enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos desenvolvida no HUL.

3.4 Amostragem

Foram incluídos todos os pacientes com idade igual ou maior que 18 anos, internados no HUL, descritos de forma seriada no período de março de 2011 a dezembro de 2012, caracterizando uma amostra de conveniência de pacientes, que apresentaram infecção por enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos e receberam terapia antimicrobiana indicada. Até dezembro de 2012 foram incluídos 127 pacientes que receberam o tratamento no HUL após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Foi considerada uma infecção por paciente e naqueles que apresentaram múltiplas infecções, foi considerada apenas a primeira.

Critérios de exclusão: 1- pacientes menores de 18 anos, 2- pacientes transferidos para outros serviços com perda de seguimento para o desfecho hospitalar, 3- ausência de obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

3.5 Definições

Infecção: O sítio de infecção foi definido segundo critérios estabelecidos pelo CDC para o diagnóstico de infecção. O foco infeccioso foi classificado como pulmonar, urinário, abdominal, corrente sanguínea, pele e partes moles, osso/articulações e outros (Garner *et al.*, 1988; Horan *et al.*, 2008). Os diagnósticos de sepse foram definidos de acordo com a reunião de consenso internacional para definições de sepse (Levy *et al.*, 2003).

A síndrome da resposta inflamatória sistêmica (do inglês, SIRS) é definida pela presença de dois ou mais dos seguintes critérios: a) temperatura corporal acima de 38°C ou abaixo de 36°C; b) frequência cardíaca maior do que 90 bpm; c) taquipnéia manifestada por frequência respiratória maior do que 20 irpm ou por hiperventilação com PaCO₂ menor do que 32 mmHg; d) leucograma com leucocitose ou leucopenia com leucócitos acima de 12,000 cels/mm³ ou abaixo de 4,000 cels/mm³, respectivamente, ou desvio à esquerda com presença de formas jovens de leucócitos maior do que 10%; sepse foi considerada como SIRS decorrente de um processo infeccioso; sepse grave foi determinada como sepse associada a pelo menos uma disfunção orgânica e choque séptico foi considerado quando foi necessária a administração de agentes vasopressores devido à hipotensão arterial persistente após reposição volêmica.

Nos pacientes admitidos na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) foram calculados:

Índice de gravidade: para avaliar a gravidade da doença foi calculado o escore *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation* (APACHE II) no dia da admissão na Unidade de Terapia Intensiva (Knauss *et al.*, 1981).

Disfunções orgânicas: para avaliar a presença de disfunções orgânicas foi calculado o escore *Sequential Organ Dysfunction Assessment* (SOFA) diariamente a partir da admissão na UTI (Vincent *et al.*, 1996). Esse escore avalia a função de seis sistemas orgânicos principais: respiratório, cardiovascular, renal, hepático, coagulação e neurológico. A pontuação de um ou dois pontos para cada sistema orgânico foi considerada disfunção orgânica e três ou quatro pontos foi considerada falência orgânica.

Doença crônica: Foram avaliadas as comorbidades de Charlson para a avaliação de doenças crônicas. O índice de comorbidades de Charlson é composto por vinte condições clínicas selecionadas empiricamente com base no efeito sobre o prognóstico de pacientes internados num serviço de medicina geral dos Estados Unidos (Charlson *et al.*, 1987). Neste estudo, foram avaliadas as comorbidades e categorizadas em uma, duas ou mais de 3 comorbidades segundo Charlson.

Terapia: uso de pelo menos um antimicrobiano sensível *in vitro* por pelo menos 48 horas. Foram avaliados se monoterapia ou terapia antimicrobiana associada, tempo de início (< 12 horas, > 12 e até 24 horas, entre 24h-72h e > 72h), com pelo menos uma droga sensível *in vitro*. Foi avaliada dose de ataque nos pacientes que receberam colistina e dose dobrada entre os que receberam tigeciclina, quando indicada. Também foi estudado sinergismo entre 2 e 3 antimicrobianos entre os isolados resistentes à polimixina, pelo método *Time Kill* (Sheng *et al.*, 2011)

3.6 Coleta de dados

Identificados os casos por meio dos registros de notificação de infecção nosocomial da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH), foi feita análise dos prontuários desses casos para obter as variáveis estudadas. Foi mantido sigilo do paciente e os dados coletados se destinaram apenas ao presente trabalho. Na data do diagnóstico de infecção foram coletados dados demográficos e dados de diagnóstico de admissão hospitalar, padronizados pelo CID – 10, e diagnóstico do foco de infecção. Foram coletados dados de resultados de culturas e padrão de sensibilidade da data do diagnóstico de infecção. No primeiro dia de internação na UTI foram coletados dados para o cálculo do escore APACHE II e as comorbidades Charlson. Os dados para o cálculo do escore SOFA foram coletados diariamente, a partir da admissão na UTI, alta da UTI ou morte (saída). Foram coletados dados de tratamento, tais como, antimicrobianos utilizados concomitantes, intervenções terapêuticas como necessidade de ventilação mecânica, diálise, cirurgias e uso de drogas vasoativas.

Os pacientes foram acompanhados durante todo o período de internação e foi anotado o tempo de internação hospitalar, tempo de internação em UTI nos que estiveram em UTI, e desfecho hospitalar, considerado como alta ou morte.

Foram avaliadas mortalidade hospitalar, mortalidade relacionada à infecção, ou seja, quando ocorreu na fase aguda da infecção ou na vigência do

tratamento da infecção (Perez *et al.*, 2010), óbito em 30 dias e em 14 dias, sendo este apenas nos pacientes que estiveram na UTI.

3.7 Amostras biológicas

Foram avaliadas as amostras de sangue, urina, secreções, líquidos cavitários e fragmentos de tecidos. Confirmação da identificação bacteriana, teste de sensibilidade e detecção de ESBL pelo Sistema Automatizado Vitek II, bioMérieux^R. Todas as amostras de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos foram confirmadas pelo Laboratório de Microbiologia do HUL e foi realizado o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, determinando a CIM de acordo com CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), documento M100 S20 2012 e Eucast 2012, Todas as enterobactérias foram identificadas pelo sistema Vytex II e confirmadas pela técnica de disco-difusão (Kirky-Bauer). Os níveis de corte para CIM foram os seguintes:

Antimicrobiano	Sensível	Intermediário	Resistente
Ertapenem	$\leq 0,5 \mu\text{g/mL}$	$= 1 \mu\text{g/mL}$	$\geq 2 \mu\text{g/mL}$
Meropenem	$\leq 1 \mu\text{g/mL}$	$= 2 \mu\text{g/mL}$	$\geq 4 \mu\text{g/mL}$
Imipenem	$\leq 1 \mu\text{g/mL}$	$= 2 \mu\text{g/mL}$	$\geq 4 \mu\text{g/mL}$

Os níveis de corte para halo através da técnica de disco-difusão foram os seguintes:

Antimicrobiano	Sensível	Intermediário	Resistente
Ertapenem	≥ 25 mm	22-24 mm	≤ 21 mm
Meropenem	≥ 23 mm	20-22 mm	≤ 19 mm
Imipenem	≥ 23 mm	20-22 mm	≤ 19 mm

Posteriormente foram encaminhadas ao Laboratório de Investigação Médica LIM 54, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, para confirmação, biologia molecular, por meio da técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para pesquisa de KPC, Oxa-48 e NDM, tipagem molecular pela técnica de eletroforese de campo pulsado (PFGE), além da concentração inibitória mínima com a técnica de microdiluição em caldo para gentamicina, polimixina B, colistina, imipenem, meropenem, tigeciclina e fosfomicina. Os testes de sinergismo *in vitro* entre as drogas utilizadas no tratamento também foram realizados pelo método *Time kill*.

3.7.1 Microdiluição em caldo

As cepas resistentes ao imipenem tiveram suas CIMs determinadas pelo método de microdiluição em caldo Mueller-Hinton Cátion Ajustado (CMHCA), conforme normas padronizadas pelo CLSI, 2005, (CLSI, M100-S15, 2005).

Controle de Qualidade: de acordo com os critérios do CLSI, foram utilizados como cepas controle *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *E.coli* ATCC 25922,

Para determinação da CIM pelo método da microdiluição em caldo os seguintes passos foram seguidos:

- 1- Preparo da solução estoque do antimicrobiano - o antimicrobiano a ser testado continha em seu rótulo as seguintes informações: número do lote, prazo de validade e a potência expressa em UI/mg ou µg/mg. Para o cálculo da quantidade necessária do antimicrobiano a ser utilizada foi aplicada a seguinte fórmula:

$$\text{Peso (mg)} = \text{Volume (mL)} \times \text{Concentração (µg/mL)}$$

$$\text{Potência (µg/mg)}$$

Foi utilizado o solvente apropriado para cada antimicrobiano (CLSI, M100-S12, 2005). A concentração final da solução estoque foi de 10,000 µg/mL.

Número de diluições: as concentrações que foram testadas seguiram os cortes descritos nas tabelas do documento CLSI, M100-S20, 2012 (para uso com M7-A5, CIM), normalmente de 256 µg/mL a 0,125 µg/mL. Para obter a solução de 256 µg/mL, a solução estoque com concentração igual a 10,000 µg/mL foi diluída com o diluente adequado (CLSI, M100-S12, 2005), até obter uma concentração de 256 µg/mL.

Preparo das diluições na placa: 50 μ L de meio de cultura CMHCA (Caldo Mueller-Hinton Cátion Ajustado) foi colocado em todos os pocinhos da placa, exceto na coluna 1, Cem (100) μ L da diluição a 256 μ g/mL foi colocado em todos os pocinhos da coluna 1, Com uma pipeta multicanal, foi realizada diluição seriada do antimicrobiano pipetando 50 μ L do primeiro pocinho da linha A (A1) para o segundo pocinho da linha A (A2). Homogeneizado com a pipeta e em seguida pipetado 50 μ L do pocinho A2 para o A3, Este procedimento foi realizado até o pocinho A11, deixando o pocinho A11 com volume final de 100 μ L, o qual foi designado como controle de esterilidade (não foram acrescentadas células bacterianas neste poço, pois permite verificar a ocorrência de contaminação durante a diluição do antimicrobiano). O último poço de cada linha (A12 – H12 pocinho de cada linha (A12 –) foi utilizado como controle de crescimento bacteriano, ou seja, 50 μ L de meio de cultura MHCA + 50 μ L de suspensão bacteriana (diluída 1:100).

Preparo da suspensão bacteriana: foi preparada uma suspensão bacteriana na escala 0,5 de McFarland ($1,8 \times 10^8$ UFC/mL) por espectrofotometria e diluída esta suspensão 1:100 em solução fisiológica ou MHCA ($1,8 \times 10^6$ UFC/mL).

Inoculação da suspensão bacteriana: foi adicionado 50 μ L desta solução diluída nos poços 1 a 10 e no poço 12 de todas as colunas (A a H). Após o preparo das diluições, foi realizada inoculação nos pocinhos dentro de 30 minutos. A concentração final da suspensão foi de aproximadamente 5×10^5 UFC/mL. Após semeadura, as placas foram homogeneizadas sobre a bancada em movimento rotatório. Foi colocado sob as placas um papel de filtro estéril umedecido com água destilada estéril ou um saco plástico estéril e foram

incubadas as placas a 35°C por 16 a 20 horas, atmosfera ambiente (CLSI, M100-S12, 2005).

Leitura dos CIMs: a leitura das placas foi realizada em local iluminado ou com auxílio de uma luminária ou de um espelho para leitura das placas. O CIM foi determinado de acordo com a observação de crescimento bacteriano nos pocinhos e através de um leitor de ELISA, utilizando um comprimento de onda de 450 nm (o controle de esterilidade será o BRANCO do teste).

3.7.2 Determinação do sinergismo

3.7.2.1 Método *Time Kill*

Análise tempo-morte (*Time kill*) foi utilizada para avaliar a atividade de combinações antimicrobianas (Petersen *et al.*, 2006). Caldo de Mueller-Hinton foi inoculado com a suspensão bacteriana para atingir uma suspensão final de 5×10^5 UFC/mL. Os antimicrobianos foram acrescentados às concentrações de 0,5 x CIM (concentração subinibitória). O volume final de cada concentração bacteriana e das drogas foi 10 mL. Os frascos de incubação foram mantidos em banho-maria sob agitação a 35°C. Amostras foram retiradas de cada frasco com a concentração bacteriana e a droga no tempo 0, 2, 4, 6, e 24 horas a partir da adição da droga. Alíquotas de 100 µL foram plaqueadas em placas com agar Mueller-Hinton. Contagens bacterianas (expressas em $\log_{10}$ UFC/mL) foram realizadas após incubação de 18 a 24 horas a 35°C em ar

ambiente. A cada intervalo de tempo, foi determinado o valor $\log_{10}$ de contagem de colônias viáveis. Sinergismo entre uma combinação antimicrobiana foi definido quando houve decréscimo $\geq 2 \log_{10}$ na UFC/mL comparado com seu constituinte mais ativo. Atividade bactericida foi definida como uma redução mínima de $3\text{-}\log_{10}$ na contagem bacteriana em 24 horas (Sheng *et al.*, 2011).

3.7.3 Tipagem Molecular

Protocolo para caracterização molecular por PFGE:

A tipagem molecular foi realizada pela técnica de eletroforese de campo pulsado, de acordo com os protocolos descritos por Pfaller *et al.*, 1993.

Preparo da suspensão bacteriana: as amostras foram repicadas para meio Agar Sangue (AS) de carneiro 5% ou meio TSA, incubadas por 18-24h a 37°C. Três a cinco colônias do crescimento em AS para tubos contendo 3mL TSB e incubadas a 37°C, *overnight*. Os microtubos foram pesados e identificados, e o crescimento do caldo TSB transferido para os respectivos microtubos. Os microtubos foram centrifugados por 20 minutos a 11,000 rpm. Foi retirado o sobrenadante e adicionado 1mL de solução fisiológica estéril ao sedimento. O sedimento foi homogeneizado e transferido para tubos previamente pesados e identificados. Esses tubos foram centrifugados por 20 min, a 11,000 rpm e 4° C. Após retirado o sobrenadante, foram realizadas duas lavagens com solução fisiológica estéril. Após a última lavagem, foi retirado

totalmente o sobrenadante e pesado o microtubo com o sedimento bacteriano. A massa bacteriana obtida foi calculada e preparada uma suspensão de bactéria na concentração de 100 μ g/ μ L em EDTA 25mM pH8,0.

Preparo dos blocos de agarose: o banho-maria (BM) foi ajustado para temperatura de 56°C. Após a fundição da agarose *low melting* (2% em TBE 0,5X), esta foi deixada no BM 56° C. Os microtubos foram identificados com os números das amostras e foi adicionado 300 μ L de tampão TEM. A esse tampão foram adicionados 5 μ L da suspensão bacteriana a 100 μ g/ μ L. Os microtubos foram homogeneizados e colocados no banho-maria a 56°C, foi adicionado 30 μ L de Lisozima 20mg/mL, e após, foi adicionado 340 μ L de agarose e homogeneizado. Essa mistura foi distribuída em moldes e deixada por 30 minutos a 4°C.

Etapas de extração do DNA bacteriano: foram distribuídos 2mL de tampão EC nos pocinhos de uma placa de cultura de células (24 pocinhos). Os bloquinhos de agarose foram removidos dos moldes e colocados nos pocinhos contendo tampão EC. Foram incubados por 5h a 37°C, sob agitação suave. O tampão EC foi retirado e aos pocinhos foram adicionados 2,0mL de tampão CHEF-TE, que foi retirado e novamente adicionado 2,0mL deste tampão. Deixado a temperatura ambiente, sob agitação suave, por 30 minutos, e após, retirado o tampão CHEF-TE. Os bloquinhos foram cobertos com 2mL de tampão ESe adicionado 100 μ L de proteinase K 20mg/mL por pocinho e homogeneizado. Realizada uma incubação a 50°C *overnight*, retirado o tampão ES e realizado 5 lavagens com 2,0mL de tampão CHEF-TE. Na primeira lavagem não teve incubação e as demais tiveram intervalos de 1 hora.

Após a última lavagem, o tampão CHEF-TE foi trocado e a placa guardada sob refrigeração.

Etapa de restrição enzimática: foram adicionados 300 μ L de tampão DNS nos pocinhos que foram usados, em uma placa de cultura de célula (96 pocinhos). Com auxílio de uma espátula e bisturi, o bloquinho de agarose foi pego e cortado ao meio. Os pedaços foram colocados no pocinho contendo DNS. Após retirar o tampão DNS, foram realizadas 5 lavagens com tampão DNS, com incubações de 1 hora por lavagem. Retirado o tampão DNS e substituído com 200 μ L de tampão da enzima (sem enzima). Incubado a 5°C por 1 hora, removido o tampão da enzima e adicionado o tampão da enzima com a enzima de restrição (10U por amostra). Nova incubação a 5°C por 1 a 2h. Retirado da geladeira e incubado nas condições indicadas pelo fabricante, por um período de 15 horas. As enzimas de restrição usadas neste estudo foram X-BAL.

Preparo do gel: agarose 1% em TBE 0,5X (para o pente de 15 amostras preparar 100mL). Foram aplicados bloquinhos no gel, cuidando para não deixar bolhas de ar, vedado com agarose 1% em TBE 0,5X. Preparados 2 litros de TBE 0,5X e acrescentado 200 μ L de tiouréia 0,5M. Esse volume de TBE com tiouréia foi colocado na cuba e ajustado às condições de corrida de acordo com a tabela 3 abaixo.

Tabela 3 - Condições de corrida de PFGE para o microrganismo *Enterobacter* spp.

Microorganismo	Agarose (%)	Switch Time inicial-final	Volts/cm	Tempo de corrida	Separação dos fragmentos em Kb
<i>Enterobacter</i> spp	1,0	5,0-30,0	6,0	23hs	<50-350

Interpretação dos resultados

Os perfis eletroforéticos gerados foram agrupados utilizando-se o software de bioinformática Bionumerics® versão 7,1 (Applied Maths). Fragmentos de DNA foram manualmente curados e normalizados usando o peso *Lambda Marker* presente em cada gel. Uma tolerância de 1,5% e otimização de 0,5% foram utilizadas para a comparação de diferentes géis . O agrupamento de clusters foi realizado e gerado um dendrograma pelo método de *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA) e coeficiente Dice de similaridade.

Para definir os PFT (*Pulsed Field Type*) e subtipos encontrados, três níveis de cutoff foram seguidos: isolados com similaridade <80% foram considerados diferentes PFT. Os subtipos foram definidos a partir daqueles PFT com coeficiente Dice entre 80-95%. Isolados com similaridade >95% foram considerados idênticos.

3.7.4 Detecção de genes codificadores de KPC, OXA-48 e NDM

3.7.4.1 Extração de DNA

Foi realizada pelo GenoCIMPrep™ and Tissue DNA Isolation Kit – Amersham Pharmacia Biotech, através do procedimento E (extração de DNA de bactérias gram-negativas). A reação de amplificação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de gene codificador de KPC, OXA-48 e NDM foi realizada utilizando os *primers* descritos abaixo:

Carbapenemase <i>bla</i> _{KPC}	ATGTCACTGTATCGCCGTCT TTTTCAGAGCCTTACTGCCC	893	Bradford et al., 2004
Carbapenemase <i>bla</i> _{NDM-1}	GCGGGAATGGCTCATCACGA CGCAACACAGCCTGACTTTC	287	Chen et al., 2011
Carbapenemase <i>bla</i> _{OXA-48-F}	TGTTTTTGGTGGCATCGAT	177	Monteiro et al, 2012
Carbapenemase <i>bla</i> _{OXA-48-R}	GTAAMRATGCTTGGTTCGC		

Sequenciamento do DNA a partir dos produtos de PCR foi realizado utilizando o MegaBACE 1000, um sistema de análise de DNA de 96 capilares com a tecnologia GE Healthcare. As reações de sequenciamento foram realizadas de acordo com o protocolo para o MegaBACE 1000, utilizando o DYEnamic ET Dye Terminator Kit (com Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase) código US81090, As sequências foram analisadas pelo software Sequence Analyser utilizando oBase Caller Cimarron 3,12, A sequência genética foi comparada com banco de dados disponível na internet (BLAST – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

3.8 Análise estatística

As variáveis contínuas com distribuição normal foram expressas em média e desvio padrão. Mediana e interquartis foram utilizadas para as variáveis com distribuição não gaussiana. As variáveis categóricas foram expressas em proporção. Estatística descritiva foi utilizada para a apresentação de todas as variáveis relevantes.

A análise bivariada foi usada para comparar os grupos de sobreviventes e não sobreviventes e também os outros desfechos, como resistência à polimixina, através do risco relativo (RR). A análise das variáveis contínuas foi realizada pelo teste *t* de *Student* para aquelas com distribuição normal, e pelo equivalente não paramétrico (Mann-Whitney) para os dados com distribuição não gaussiana. As proporções das variáveis categóricas foram comparadas usando o teste de Qui-quadrado de Pearson. A regressão logística multivariada com a técnica de Forward Stepwise foi utilizada para detectar fatores de risco independentes, através da Odds Ratio (OR). A análise de sobrevivência aos 90 dias foi realizada pelo método de Kaplan-Meier. O nível de significância utilizado foi de 5%. As análises foram realizadas no Programa Epi Info 7[®] (CDC, Atlanta, USA) e SPSS[®] 20(Chicago, IL, USA).

3.9 Ética

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Londrina e pelo Comitê de Ética da Faculdade de

Medicina da Universidade de São Paulo, assim como o termo de consentimento livre e esclarecido.

4. Resultados

No período de estudo, 127 pacientes apresentaram infecções documentadas por ERC, todas relacionadas à assistência à saúde. Idade média dos pacientes foi 55,7 ($\pm$ 18) anos, 44,9% com idade superior a 60 anos e 88 (69,3%) eram do sexo masculino. Noventa e oito (77,2%) dos pacientes adquiriram infecção na Unidade de Terapia Intensiva. Os diagnósticos de admissão foram distribuídos da seguinte forma: doença infecciosa em 23 (18,1%); politrauma em 23 (18,1%); doença cardiovascular em 18 (14,2%); doença respiratória em 13 (10,2%); doença cerebrovascular em 11 (8,7%); tumor de órgão sólido em 11 (8,7%); doenças do trato gastro-intestinal em 5 (3,9%). Outros diagnósticos, como grande queimado, Aids, síndrome consuptiva, hepatopatia e transplantado renal ocorreram nos outros 23 pacientes (18,1%).

Em relação à presença de comorbidades, segundo critérios de Charlson, 97 (76,4%) apresentaram, sendo, respectivamente, uma (23; 18,1%), duas (32; 25,2%) e três (42; 33%) comorbidades. Cinquenta e nove (46,5%) foram submetidos a algum procedimento cirúrgico antes da infecção e 45 (35,4%) necessitaram de tratamento dialítico.

Quanto à colonização prévia à infecção por ERC, 76 (59,8%) eram colonizados e a mediana de tempo de colonização pós-admissão hospitalar foi de 7 (IQR 2,5-11) dias e o tempo de aquisição da infecção por ERC após admissão foi de 15 (IQR 8-30) dias. O tempo de permanência hospitalar apresentou mediana de 37 (IQR 25-59) dias.

Infecções de trato respiratório e trato urinário foram as mais frequentes com 52 (41%) e 51 (40,2%), respectivamente. Infecções em tecidos e partes moles, incluindo sítio cirúrgico, ocorreram em 13 pacientes (10,2%), infecção

de corrente sanguínea ocorreu em 9 (7%) e intra-abdominal em 2 (1,6%). Quanto à gravidade destas infecções, 28 (22%) apresentaram critérios de sepse, 21 (16,5%) sepse grave e 63 (49,6%), choque séptico.

Em relação aos sítios de isolamento, aspirado traqueal quantitativo, $\geq 10^6$ ufc/mL foi material de diagnóstico microbiológico de pneumonia em 46 (36,2%), urina em 51 (40,2%), sangue em 21 (16,5%), fragmentos de tecidos em 11 (8,7%) e outros, que inclui liquor, líquidos peritoneal e pleural em 8 (8%). Das pneumonias, 46 (88,4%) foram diagnosticadas por aspirado traqueal quantitativo, cinco por hemocultura e uma por hemocultura e líquido pleural.

Klebsiella pneumoniae foi a enterobactéria mais prevalente, em 113 (89%) dos isolados, seguida de 9 *Enterobacter* spp (7,0%), 3 *E. coli* (2,3%), 1 *Providencia* spp (0,8%), 2 *Citrobacter* spp (1,6%) e 1 *Serratia marcescens* (0,8%). Coinfecção por outros patógenos ocorreu em 55 (43,3%), sendo a mais frequente com *Acinetobacter* spp (36; 28,3%) e *Pseudomonas aeruginosa* (13; 10,2%). Presença do gene *bla_{KPC}* foi identificada em 96 (75,6%) das enterobactérias e resistência à polimixina ocorreu em 27 (21,3%).

As características dos 127 pacientes infectados por ERC e a análise univariada dos fatores associados ao óbito relacionado à infecção são apresentadas na tabela 4:

Tabela 4- Análise univariada dos fatores associados ao óbito relacionado à infecção de 127 pacientes com infecções causadas por ERC, entre março de 2011 a dezembro de 2012.

Características	Total (n=127)	Sobreviventes (n= 83)	Óbitos relacionados (n= 44)	RR (IC95%)	p
Relacionada ao paciente					
Idade (anos)	55,7 ± 18				
Idade > 60 (%)	57 (44,9)	32 (38,5)	25 (56,8)	1,29(0,99-1,70)	0,03
Sexo masculino (%)	88 (69,3)	59(71,0)	29 (65,9)	0,91(0,68-1,22)	0,34
UTI (%)	98 (77,2)	60 (72,3)	38 (86,4)	1,29 (1,01-1,65)	0,054
LOS Hospital (dias)(IQR)	37 (25-59)				
Diagnóstico de admissão (%)					
Doença infecciosa	23 (18,1)				
Politrauma	23 (18,1)				
Doença cardiovascular	18 (14,2)				
Doença respiratória	13 (10,2)				
Doença cerebrovascular	11 (8,6)				
Tumor órgão sólido	11 (8,6)				
Doença gastro-intestinal	5 (3,9)				
Outros	23 (18,1)				
Comorbidades (%)	97 (76,4)	67 (73,6)	30 (83,3)	1,39(1,10-1,75)	0,01
=1	23 (18,1)	19 (22,9)	4 (9,0)	0,74(0,58-0,94)	0,04
=2	32 (25,2)	17(20,5)	15 (34,0)	1,30(0,92-1,85)	0,07
3 ou mais	42 (33,0)	22 (26,5)	20 (45,4)	1,37(0,99-1,88)	0,02
Cirurgia (%)	59 (46,5)	41 (49,4)	18 (40,9)	0,88(0,69-1,14)	0,23
Diálise (%)	45 (35,4)	18 (21,7)	27 (61,4)	1,98(1,36-2,88)	0,0001
Colonização prévia (%)	76 (59,8)	50 (60,2)	26 (59,0)	0,98(0,75-1,27)	0,52
Tempo col pós internação (dias) (IQR)	7 (2,5-11)				
Tempo internação pré-infecção (dias) (IQR)	15 (8-30)				
Infecção (%)					
Pneumonia	52 (41,0)	25 (30,1)	27 (61,4)	1,60(1,18-2,18)	0,0006
ITU	51 (40,2)	39 (47,0)	12 (27,3)	0,75(0,59-0,96)	0,02
Corrente sanguínea	9 (7,0)	7 (8,4)	2 (4,5)	0,82(0,56-1,20)	0,33
Tecidos	13 (10,2)	10 (12,0)	3 (6,8)	0,83(0,59-1,15)	0,27
Intra abdominal	2 (1,6)	2 (2,4)	0	0,64(0,56-0,73)	0,42
Sepse	28 (22,0)	27 (32,5)	1 (2,3)	0,58(0,48-0,70)	0,0001
Sepse grave	21 (16,5)	17 (20,5)	4 (9,0)	0,76(0,59-0,99)	0,07
Choque	63 (49,6)	25 (30,1)	38 (86,4)	2,28(1,66-3,12)	0,0001

Continua

Tabela 4- Análise univariada dos fatores associados ao óbito relacionado à infecção de 127 pacientes com infecções causadas por ERC, entre março de 2011 a dezembro de 2012. (Continuação)

Características	Total (n=127)	Sobreviventes (n= 83)	Óbitos relacionados (n= 44)	RR (IC95%)	p
Sítios de isolamento (%)					
Aspirado traqueal	46 (36,2)	23 (27,7)	23 (52,7)	1,48(1,07-2,03)	0,005
Urina	51 (40,2)	39 (47,0)	12 (27,3)	0,75(0,59-0,96)	0,02
Sangue	21 (16,5)	11 (13,2)	10 (22,7)	1,29(0,84-1,99)	0,13
Tecidos	11 (8,7)	7 (8,4)	4 (9,1)	1,02(0,64-1,64)	0,56
Outros	8 (8,0)	8 (9,6)	0 (0,0)	0,63(0,54-0,72)	0,02
Patógeno (%)					
<i>K.pneumoniae</i>	113 (89,0)	74 (89,2)	39 (88,6)	0,98(0,64-1,48)	0,57
Resistência à polimixina	27 (21,3)	17 (20,5)	10 (22,7)	1,04(0,75-1,44)	0,46
Polimicrobiana	55 (43,3)	34 (41,0)	21 (47,7)	1,10(0,84-1,42)	0,29
Co-inf <i>Acinetobacter</i>	36 (28,3)	22 (26,5)	14 (31,8)	1,09(0,81-1,47)	0,33
Co-inf <i>P.aeruginosa</i>	13 (10,2)	7 (8,4)	6 (13,6)	1,23(0,73-2,08)	0,26
<i>bla_{KPC}</i> +	96 (75,6)	68 (81,9)	28 (63,6)	0,68(0,46-1,00)	0,02

RR, risco relativo; IC, intervalo de confiança; UTI, unidade de terapia intensiva; LOS, duração de internação; IQR, inter quartil range; ITU, infecção de trato urinário; Col, colonização; Co-inf, coinfeção

Ainda na tabela 4, encontramos como fatores de risco para óbito pela análise univariada as seguintes condições: idade > 60 anos (RR 1,29; IC95% 1,01-1,70; $p=0,03$); presença de comorbidades de Charlson (RR 1,39; IC95% 1,10-1,75; $p=0,01$) e ≥ 3 comorbidades com maior risco (RR 1,37; IC95% 1,01-1,88; $p=0,02$); diálise (RR 1,98; IC95% 1,36-2,88; $p<0,0001$); foco pulmonar (RR 1,60; IC95% 1,18-2,18; $p=0,0006$) e choque séptico (RR 2,28; IC95% 1,66-3,12; $p<0,0001$). Infecção de trato urinário aparece como fator protetor (RR 0,75; IC95% 0,59-0,96; $p=0,02$), assim como sepse (RR 0,58; IC95% 0,48-0,70; $p<0,0001$).

Sobre o tratamento antimicrobiano, observamos que, em relação ao tempo de início, 31 (24,4%) receberam antimicrobiano em menos de 12 horas e com pelo menos uma droga sensível *in vitro*; 43 (33,8%) em menos de 24

horas e 44 (34,5%) tiveram início do antimicrobiano após 72 horas. Quanto ao tempo de início do antimicrobiano, verificamos que a administração precoce não reduziu mortalidade. O uso de mais de um antimicrobiano sensível ocorreu em 71 (55,9%), mas também não foi significativo no óbito relacionado à infecção.(Tabela 5).

Monoterapia ocorreu em 29 pacientes (22,8%), terapia combinada com duas drogas em 22 (17,3%), com três drogas em 53 (41,7%) e com quatro drogas em 23 (18,1%). Nenhum dos esquemas teve impacto significativo no óbito relacionado à infecção.(Tabela 5).

Colistina foi a droga mais utilizada, tanto em monoterapia como na terapia associada, e seu uso ocorreu em 107 pacientes (84,2%); aminoglicosídeo em 82 (64,6%), tigeciclina e carbapenem em 69 (54,3%) cada. (Tabela 5).

Tabela 5- Tratamento das 127 infecções por ERC em relação ao tempo de início do antimicrobiano e esquemas terapêuticos utilizados, entre março de 2011 e dezembro de 2012.

Tratamento	Total (n=127) n (%)	Sobreviventes (n= 83) n (%)	Óbitos relacionados (n= 44) n (%)	RR (IC95%)	P
Início em < 12h	39 (30,7)	20 (24,1)	19 (43,2)	1,39(1,00-1,94)	0,02
Início em 12h e sensível	31 (24,4)	14 (16,9)	17 (38,6)	1,59(1,05-2,39)	0,006
Início em <24h	53 (41,7)	30 (36,1)	23 (52,3)	1,26(0,96-1,66)	0,059
Início em 24 h e sensível	43 (33,8)	22 (26,5)	21 (47,7)	1,41(1,03-1,95)	0,01
Início entre 24-72h e sensível	36 (28,3)	23 (27,7)	13 (29,5)	1,03(0,77-1,37)	0,49
Início > 72h e sensível	44 (34,5)	36 (44,6)	8 (18,2)	0,69(0,54-0,87)	0,003
Monoterapia	29 (22,8)	23 (27,7)	6 (13,6)	0,77(0,60-0,98)	0,054
Terapia Combinada	98 (77,2)	60 (72,3)	38 (86,4)	1,29(1,01-1,65)	0,054
2 drogas	22 (17,3)	16 (19,3)	6 (13,6)	0,87(0,65-1,17)	0,29
3 drogas	53 (41,7)	31 (37,3)	22 (50,0)	1,20(0,91-1,57)	0,11
4 drogas	23 (18,1)	13 (15,6)	10 (22,7)	1,19(0,81-1,74)	0,22
Colistina	107 (84,2)	67 (80,7)	40 (90,9)	1,27(0,98-1,66)	0,10
Dose de ataque	74 (69,2)	43(64,2)	31 (77,5)	1,25(0,94-1,66)	0,10
Tigeciclina	69 (54,3)	43 (51,8)	26 (59,0)	1,10(0,86-1,42)	0,27
Dose dobrada	46 (66,8)	29 (67,5)	17 (65,4)	0,96(0,65-1,43)	0,53
Carbapenem	69 (54,3)	42 (50,6)	27 (61,4)	1,16(0,90-1,49)	0,16
Aminoglicosídeo	82 (64,6)	51 (61,4)	31 (70,4)	1,14(0,88-1,47)	0,20
> 1 atm sensível	71 (55,9)	45 (54,2)	26 (59,0)	1,07(0,83-1,37)	0,36

RR, risco relativo; IC, intervalo de confiança; atm, antimicrobiano

Quanto ao desfecho mortalidade hospitalar e os esquemas antimicrobianos utilizados, observa-se que monoterapia apresenta menor mortalidade (7 óbitos, 24,1%), entretanto, monoterapia foi utilizada com frequência no tratamento de infecção de trato urinário enquanto terapia combinada prevalece nas demais infecções. Óbito entre os que receberam terapia combinada ocorreu em 71 (72,4%). A combinação mais frequente foi a associação de colistina + tigeciclina + amicacina, com ou sem carbapenem, em 40 pacientes, com mortalidade de 70,6%; a segunda categoria de combinação foi colistina + amicacina + carbapenem, em 19 pacientes, com 14 óbitos (73,7%) e depois colistina + tigeciclina + carbapenem em 16, com 10 óbitos (62,5%). Combinação dupla, com colistina e tigeciclina ocorreu em 6, com 4 óbitos (66,7%); com colistina e amicacina em 5, com 3 óbitos (60%); colistina + carbapenem em 4, com 100% de óbito; tigeciclina + amicacina em 3, com 1 óbito (33,3%); tigeciclina + carbapenem em 2, com 1 óbito (50%), assim como carbapenem + amicacina, também em 2, com 1 óbito (50%). (Tabela 6).

Tabela 6- Desfecho dos pacientes de acordo com o esquema de tratamento utilizado no tratamento das 127 infecções por ERC, de março de 2011 a dezembro de 2012.

Esquema antimicrobiano	Total (n)	Sobreviventes (n)	Óbitos relacionados (n)	Mortalidade Geral (%)
Monoterapia	29	22	7	24,1
Polimixina	17	12	5	29,4
Tigeciclina	1	1	0	0
Aminoglicosídeo	9	5	2	22,2
Carbapenem	1	1	0	0
Fosfomicina	1	1	0	0
Terapia Combinada	98	27	71	72,4
Poli +tige	6	2	4	66,7
Poli+tige+AG	17	5	12	70,6
Poli+tige+AG+carba	23	2	21	70,6
Poli+AG+carba	19	5	14	73,7
Poli+Tige+Carba	16	6	10	62,5
Poli +AG	5	2	3	60
Poli+carba	4	0	4	100,0
Tige + AG	3	2	1	33,3
Tige+carba	2	1	1	50,0
Tige+AG+Carba	1	1	0	0
Carba+AG	2	1	1	50,0

ERC, enterobactéria resistente aos carbapenêmicos; Poli, polimixina; Tige, tigeciclina; AG, aminoglicosídeo; carba, carbapenêmico

As mortalidades observadas foram as seguintes: mortalidade hospitalar geral: 61,4%; relacionada à infecção: 34,6%; óbito em 30 dias: 28,3%. Quando avaliados os pacientes de UTI, a mortalidade hospitalar foi de 70,4%; relacionada à infecção de 38,8%, óbito em 30 dias de 30,6% e em 14 dias 29,6%. A mortalidade hospitalar foi significativamente menor entre os que não estiveram na UTI ($p<0,001$). Tabela 7

Tabela 7 - Mortalidade hospitalar, relacionada à infecção, em 30 dias e 14 dias, entre pacientes com infecção por ERC na UTI e fora da UTI, entre março de 2011 e dezembro de 2012.

Mortalidade	Geral (n=127)	UTI (n=98)	Fora UTI (n=29)	p
Geral	78 (61,4%)	69 (70,4%)	9 (31,0%)	<i><0,001</i>
Relacionada a infecção	44 (34,6%)	38 (38,8%)	6 (20,7%)	<i>0,05</i>
30 dias	36 (28,3%)	30 (30,6%)	6 (20,7%)	0,21
14 dias	--	29 (29,6%)		

UTI, unidade de terapia intensiva

Entre os 98 pacientes que estiveram na UTI, foram coletados dados para cálculo do APACHE e SOFA, conforme se observa na tabela 8, APACHE > 20 ($p=0,007$) e SOFA de saída da UTI >6 ($p=0,0002$) foram fatores de risco para óbito relacionado à infecção, em análise univariada. A mediana de permanência na UTI foi de 18 dias (1-177). (Tabela 8).

Tabela 8- Variáveis APACHE de admissão e SOFA de admissão e saída entre os 98 pacientes com infecção por ERC que estiveram na UTI, entre março de 2011 e dezembro de 2012.

Variável	Total (n=98)	Sobreviventes (n= 60)	Óbitos relacionados (n= 38)	RR (IC95%)	p
APACHE (IQR)	20,6±7,1 20(15,5-26,5)				
APACHE >20	48 (49,0%)	23 (38,3%)	25 (65,8%)	1,54(1,10-2,16)	0,007
SOFA admissão (IQR)	7,7±3,7 7,5 (5-11)				
SOFA admissão > 6	62 (63,3%)	36 (60,0%)	26 (68,4%)	1,14(0,83-1,57)	0,26
SOFA saída (IQR)	7,1±5,5 5 (2,5-12)				
SOFA saída >6	42 (42,9%)	17 (28,3%)	25 (65,8%)	1,89(1,27-2,81)	0,0002
LOS UTI (IQR)	18 (1-177)				

APACHE, Acute Physiology and Chronic Health Disease, SOFA, Sepsis Related Organ Failure Assessment; ERC, enterobactéria resistente aos carbapenêmicos; UTI, unidade de terapia intensiva; RR, risco relativo; IC, intervalo de confiança; LOS, tempo de permanência; IQR; inter quartil range

Observa-se também que, entre os pacientes da UTI, a ocorrência de choque séptico foi mais frequente que sepse e sepse grave, sendo a sepse mais comum entre os pacientes fora da UTI. (Gráfico 2)

Gráfico 2- Ocorrência de sepse, sepse grave e choque séptico em pacientes com infecção por ERC na UTI (n=98) e fora da UTI (n=29), entre março de 2011 e dezembro de 2012.

Como fator de risco para óbito relacionado à infecção entre os 127 pacientes infectados por ERC, encontramos na análise multivariada, apenas choque (OR=14,69; IC95% 5,31-39,16; $p<0,0001$). (Tabela 9).

Tabela 9- Variáveis independentes associadas com óbito relacionado à infecção entre 127 pacientes infectados por ERC entre março de 2011 e dezembro de 2012.

Variável	Total	Sobreviventes	Óbito relacionado	OR (IC95%)	p
Choque	63 (49,6%)	25 (30,1%)	38 (86,4%)	14,69(5,51-39-16)	<0,0001

ERC, enterobactéria resistente aos carbapenêmicos; OR, Odds ratio; IC, intervalo de confiança

O perfil de sensibilidade dos isolados mostra os seguintes resultados, com os respectivos critérios e método utilizado, conforme descrito na tabela 10:

Tabela 10- Perfil de sensibilidade das ERC de acordo com CIM e método padronizado.

Antimicrobiano	Sensível % (n)	Nº testado	Critério CIM para sensibilidade	Método
Polimixina	78,7 (100)	127	$\leq 2\text{ug/mL}$	Eucast
Gentamicina	18,1 (23)	127	$\leq 4\text{ ug/mL}$	CLSI
Tigeciclina	58,3 (49)	84	$\leq 1\text{ ug/mL}$	Eucast
	92,8 (78)	84	$\leq 2\text{ ug/mL}$	FDA
Fosfomicina	100,0 (29)	29	$\leq 64\text{ug/mL}$	CLSI
	96,5 (28)	29	$\leq 32\text{ ug/mL}$	Eucast
Imipenem	11,0 (14)	127	$\leq 1\text{ ug/mL}$	CLSI

CIM, concentração inibitória mínima; Eucast, *European Committee on Susceptibility Testing*; CLSI, *Clinical and Laboratory Standards Institute*; FDA, *Food and Drug Administration*

Duas curvas de sobrevida de Kaplan Meier foram realizadas para avaliar mortalidade em 90 dias. Uma foi comparando monoterapia, terapia combinada com duas e três ou mais drogas, considerando todas as infecções, incluindo trato urinário, e nesta houve diferença entre os esquemas, com $p=0,007$ (Log rank) (Gráfico 4). A outra, comparando apenas terapia combinada com duas ou três ou mais drogas e não consideradas as infecções de trato urinário, em que não houve diferença significativa ($p=0,32$, log rank). (Gráfico 3).

Gráfico 3- Curva de sobrevida de Kaplan Meier com avaliação de terapia dupla e tripla nas infecções por enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos, com exceção das infecções urinárias.

Gráfico 4- Curva de sobrevivência de Kaplan Meier com avaliação de monoterapia, terapia dupla e tripla nas infecções por enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos.

Fatores de risco para resistência à polimixina

Análise univariada dos fatores de risco associados com resistência à polimixina está descrita na tabela 11, Nesta análise, não houve diferença entre presença de comorbidades, de acordo com critérios de Charlson, nem presença de cirurgias, diálise, colonização prévia (59,8% eram previamente

colonizados por ERC) à infecção ou uso prévio de antimicrobianos em geral (90,5% receberam algum antimicrobiano entre penicilina, cefalosporina, quinolona, carbapenem ou polimixina), sendo que 52 pacientes (40,9%) receberam pelo menos 3 antimicrobianos prévio à infecção. Entretanto, uso prévio de carbapenêmicos (RR= 1,20, IC95% 1,01-1,44, $p=0,03$) e de polimixina (RR=1,26, IC95% 0,97-1,65, $p=0,03$) foram fatores significativos para resistência à polimixina na análise bivariada. Também não houve diferença quanto ao sítio de infecção ou gravidade da infecção, isto é, presença de sepse grave ou choque séptico. (Tabela 11)

Nenhum esquema antimicrobiano ou tempo de início apresentou diferença quanto ao risco de resistência à polimixina. O uso de mais de um antibiótico com sensibilidade *in vitro* ocorreu em 71 pacientes (55,9%) e apresenta-se como fator protetor para resistência à polimixina (RR 0,71; IC95% 0,57-0,87; $p=0,0004$). (Tabela 11)

Tabela 11- Análise univariada dos fatores de risco associados à resistência à polimixina em 127 pacientes com infecções causadas por ERC entre março de 2011 a dezembro de 2012.

Características	Total (n=127)	Sensível à polimixina (n= 100)	Resistente à polimixina (n= 27)	RR (IC95%)	p
Relacionada ao paciente					
Idade (anos) (%)	55,7 ± 18				
Idade > 60 (%)	57 (44,9)	44 (44,0)	13 (48,1)	1,03(0,96-1,24)	0,43
Sexo masculino (%)	88 (69,3)	68 (68,0)	20 (74,0)	1,06(0,88-1,27)	0,36
UTI (%)	98 (77,2)	77 (77,0)	21 (77,8)	1,00(0,81-1,24)	0,57
Los Hospital (IQR)	37 (25-59)				
Comorbidades (%)	97 (76,4)	75 (75,0)	22 (81,5)	1,07(0,88-1,30)	0,33
=1	23 (18,1)	14 (14,0)	9 (33,3)	1,35(0,96-1,90)	0,02
=2	32 (25,2)	27 (27,0)	5 (18,5)	0,91(0,75-1,09)	0,26
3 ou mais	42 (33,0)	34 (34,0)	8 (29,6)	0,95(0,79-1,15)	0,42
Cirurgia (%)	59 (46,5)	48 (48,0)	11 (40,7)	0,94(0,78-1,12)	0,32
Diálise (%)	45 (35,4)	34 (34,0)	11 (40,7)	1,06(0,87-1,29)	0,33
Colonização	76 (59,8)	57 (57,0)	19 (70,4)	1,12(0,94-1,34)	0,14
Prévia(%)					
Tempo de internação pré-infecção (dias)(IQR)	15 (8-30)				
Tempo de colonização pós internação (dias) (IQR)	7 (2,5-11)				
Uso prévio ATM (%)	115 (90,5)	90 (90,0)	25 (92,6)	1,06(0,81-1,39)	0,50
1 atm prévio	32 (25,2)				
2 atm prévio	31 (24,4)				
3 ou + atm prévio	52 (40,9)				
Uso prévio carba	67 (52,8)	48 (48,0)	19 (70,4)	1,20(1,01-1,44)	0,03
Uso prévio poli	32 (25,2)	21 (21,0)	11 (40,7)	1,26(1,01-1,65)	0,03
Uso prévio tazo	78 (61,4)	63 (63,0)	15 (55,6)	0,93(0,77-1,13)	0,31
Uso prévio quino	35 (27,6)	28 (28,0)	7 (25,9)	0,97(0,80-1,19)	0,51
Uso prévio cefalo	57 (44,9)	44 (44,0)	13 (48,1)	1,03(0,86-1,24)	0,43
Infecção (%)					
Pneumonia	52 (41,0)	40 (40,0)	12 (44,4)	1,04(0,86-1,25)	0,41
Trato urinário	51 (40,2)	39 (39,0)	12 (44,4)	1,04(0,86-1,26)	0,38
Corrente sanguínea	9 (7,0)	7 (7,0)	2 (7,4)	1,01(0,70-1,45)	0,60
Pele/partes moles	13 (10,2)	12 (12,0)	1 (3,7)	0,83(0,69-1,00)	0,18
Intra-abdominal	2 (1,6)	2 (2,0)	0	0,78(0,71-0,85)	0,61
Sepse grave	21 (16,5)	15 (15,0)	6 (22,2)	1,12(0,84-1,49)	0,26
Choque	63 (49,6)	48 (48,0)	15 (55,6)	1,06(0,88-1,27)	0,31
Sítios de isolamento (%)					
Aspirado traqueal	46 (36,2)	36 (36,0)	10 (37,0)	1,00(0,83-1,21)	0,54
Urina	51 (40,2)	39 (39,0)	12 (44,4)	1,04(0,86-1,26)	0,38
Sangue	21 (16,5)	15 (15,0)	6 (22,2)	1,12(0,84-1,49)	0,26
Tecidos	11 (8,7)	10 (10,0)	1 (3,7)	0,85(0,69-1,05)	0,27
Outros	8 (8,0)	8 (8,0)	0 (0,0)	0,77(0,70-0,85)	0,13

Continua

Tabela 11- Análise univariada dos fatores de risco associados à resistência à polimixina em 127 pacientes com infecções causadas por ERC entre março de 2011 a dezembro de 2012. (Continuação)

Características	Total (n=127)	Sensível à polimixina (n= 100)	Resistente à polimixina (n= 27)	RR (IC95%)	p
Patógeno (%)					
<i>K. pneumoniae</i>	113(89,0)	87 (87,0)	26 (96,3)	1,20(1,01-1,43)	0,15
Polimicrobiana	55 (43,3)	46 (46,0)	9 (33,3)	0,89(0,75-1,07)	0,16
Co-inf <i>Acinetobacter</i>	36 (28,3)	30 (30,0)	6 (22,2)	0,92(0,76-1,11)	0,29
Co-inf <i>P.aeruginosa</i>	13 (10,2)	11 (11,0)	2 (7,4)	0,92(0,71-1,18)	0,44
<i>bla</i> _{KPC} +	96 (75,6)	76 (76,0)	20 (74,0)	0,97(0,78-1,21)	0,50
Tratamento (%)					
Início <12h	39 (30,7)	29 (29,0)	10 (37,0)	1,08(0,87-1,33)	0,28
Início < 12h e sensível	31 (24,4)	27 (27,0)	4 (14,8)	0,87(0,73-1,04)	0,14
Início em <24h	53 (41,7)	39 (39,0)	14 (51,9)	1,12(0,92-1,35)	0,16
Início < 24h e sensível	43 (33,8)	36 (36,0)	7 (25,9)	0,91(0,76-1,08)	0,22
Início entre 24-72h e sensível	36 (28,3)	31 (31,0)	5 (18,5)	0,88(0,73-1,04)	0,14
Início > 72h e sensível	44 (34,6)	33 (33,0)	11 (40,7)	1,07(0,8-1,31)	0,29
>1 atm sensível	71 (55,9)	64 (64,0)	7 (25,9)	0,71(0,57-0,87)	0,0004
Monoterapia	29 (22,8)	21 (21,0)	8 (29,6)	1,11(0,87-1,42)	0,24
Terapia Combinada	98 (77,2)	79 (79,0)	19 (70,4)	0,89(0,70-1,14)	0,24
2 atm	22 (17,3)	18 (18,0)	4 (14,8)	0,95(0,76-1,19)	0,47
3 atm	53 (41,7)	43 (43,0)	10 (37,0)	0,94(0,79-1,13)	0,37
4 atm	23 (18,1)	18 (18,0)	5 (18,5)	1,00(0,79-1,27)	0,57
Colistina	107 (84,2)	85 (85,0)	22 (81,5)	0,94(0,72-1,23)	0,42
Dose ataque	74 (69,2)	57 (67,0)	17 (77,3)	1,10(0,91-1,33)	0,25
Tigeciclina	69 (54,3)	55 (55,0)	14 (51,8)	0,97(0,81-1,16)	0,46
Carbapenem	69 (54,3)	56 (56,0)	13 (48,1)	0,93(0,77-1,12)	0,30
Aminoglicosídeo	82 (64,6)	64 (64,0)	18 (66,7)	1,02(0,85-1,23)	0,49
Mortalidade (%)					
Geral	78 (61,4)	62 (62,0)	16 (59,3)	0,97(0,80-1,17)	0,48
Relacionada à infecção	44 (34,6)	34 (34,0)	10 (37,0)	1,02(0,84-1,24)	0,46
30 dias	36 (28,3)	31 (31,0)	5 (18,5)	0,88(0,73-1,04)	0,14

RR, risco relativo; IC, intervalo de confiança; UTI, unidade de terapia intensiva, LOS, tempo de permanência; IQR, inter quartil range; atm, antimicrobiano; Co-inf, Coinfecção; Carba, carbapenêmico, poli, polimixina, cafalo, cefalosporina; Tazo, piperacilina-tazobactam; quino, quinolona

Na análise multivariada, todas as variáveis com $p < 0,15$ foram selecionadas, e o único fator que permanece como risco independente para resistência à polimixina é o uso prévio de carbapenêmico (OR 2,95; IC95%

1,12-7,78; $p= 0,02$). O uso de mais de um antimicrobiano sensível *in vitro* aparece como fator de proteção (OR 0,18; IC95% 0,06-0,48; $p= 0,001$), conforme tabela 12.

Tabela 12- Análise multivariada dos fatores de risco associados à resistência à polimixina em 127 pacientes com infecções causadas por ERC entre março de 2011 e dezembro de 2012.

Variável	Total (n=127)	Sensível à polimixina (n= 100)	Resistente à polimixina (n= 27)	OR (IC95%)	p
Uso prévio de carbapenem	67 (52,8%)	48 (48,0%)	19 (70,4%)	2,95(1,12-7,78)	0,02
Uso de mais de 1 atm sensível	71 (55,9%)	64 (64,0%)	7 (25,9%)	0,18(0,06-0,48)	0,001

OR, odds ratio; IC, intervalo de confiança; atm, antimicrobiano

Fatores de risco para óbito entre infectados por ERC resistente à polimixina

Na análise dos pacientes com infecções resistentes à polimixina (n=27), a idade média foi 54,8 ($\pm 19,6$) anos e 20 (74,1%) eram do sexo masculino. Vinte e um pacientes (77,8%) estiveram na UTI e apresentaram mediana de permanência hospitalar de 45 dias (22-59 IQR). Pacientes em diálise apresentaram risco relativo de morte de 2,23 (IC95%: 1,01-5,05), com $p=0,02$, Pneumonia (RR= 1,92; IC 95% 1,01-3,92; $p=0,04$), choque (RR= 2,29; IC 95% 1,20-4,35; $p=0,007$) e isolamento do agente em sangue (RR=4,57; IC95% 1,01-27,79; $p=0,01$) foram fatores significantes para óbito entre os pacientes com infecções por ERC resistentes à polimixina na análise univariada. (Tabela 13).

Quanto ao tratamento dessa população, 19 (70,4%) receberam terapia combinada, sendo que 10 (37%) com 3 drogas. Início precoce (12 horas ou 24 horas) e sensibilidade *in vitro* de pelo menos um agente ocorreram em 3 e 6 pacientes, respectivamente e não houve significância quanto ao risco de óbito. Apesar de resistência à polimixina, dentre os pacientes que morreram nesse grupo (10), 100% receberam polimixina para tratamento. (Tabela 13).

Tabela 13- Análise univariada dos fatores de risco associados ao óbito relacionado à infecção de 27 pacientes com infecções causadas por enterobactérias resistentes às polimixinas, entre março de 2011 e dezembro de 2012.

Características	Total (n=27)	Sobrevi- ventes (n= 17)	Óbito relacionado (n= 10)	RR (IC95%)	p
Relacionadas ao paciente					
Idade (anos)	54,8±19,6				
Idade > 60 (%)	13 (48,1)	7 (41,2)	6 (60,0)	1,32(0,72-2,42)	0,29
Sexo masculino (%)	20 (74,1)	13 (76,5)	7 (70,0)	0,87(0,42-1,80)	0,52
UTI (%)	21 (77,8)	12 (70,6)	9 (90,0)	1,45(0,87-2,44)	0,25
LOS Hospital (dias) (IQR)	45 (22-59)				
Comorbidades (%)	22 (81,5)	13 (76,5)	9 (90,0)	1,35(0,77-2,36)	0,37
=1	9 (33,3)	7 (41,2)	2 (20,0)	0,71(0,41-1,22)	0,24
=2	5 (18,5)	2 (11,8)	3 (30,0)	1,70(0,56-5,17)	0,24
3 ou mais	8 (29,6)	4 (23,5)	4 (40,0)	1,36(0,64-2,91)	0,31
Cirurgia (%)	11 (40,7)	8 (47,1)	3 (30,0)	0,77(0,44-1,35)	0,32
Diálise (%)	11 (40,7)	4 (23,5)	7 (70,0)	2,23(1,01-5,05)	0,02
Infecção (%)					
Pneumonia	12 (44,4)	5 (29,4)	7 (70,0)	1,92(1,01-3,92)	0,04
Trato urinário	12 (44,4)	10 (58,8)	2 (20,0)	0,56(0,30-1,01)	0,057
Corrente sanguínea	2 (7,4)	1 (5,9)	1 (10,0)	1,28(0,31-5,27)	0,61
Pele/partes moles	1 (3,7)	1 (5,9)	0	0,61(0,45-0,83)	0,62
Sepse grave	6 (22,2)	5 (29,4)	1 (10,0)	0,68(0,40-1,14)	0,25
Choque	15 (55,6)	6 (35,3)	9 (90,0)	2,29(1,20-4,35)	0,007

Continua

Tabela 13- Análise univariada dos fatores de risco associados ao óbito relacionado à infecção de 27 pacientes com infecções causadas por enterobactérias resistentes às polimixinas, entre março de 2011 e dezembro de 2012. (Continuação)

Características	Total (n=27)	Sobrevi- ventes (n= 17)	Óbito relacionado (n= 10)	RR (IC95%)	p
Sítios isolamento(%)					
Aspirado traqueal	10 (37,0)	5 (29,4)	5 (50,0)	1,41(0,70-2,81)	0,25
Urina	12 (44,4)	10 (58,8)	2 (20,0)	0,56(0,30-1,01)	0,057
Sangue	6 (22,2)	1 (5,9)	5 (50,0)	4,57(1,01-27,79)	0,01
Patógeno (%)					
<i>K.pneumoniae</i>	26 (96,3)	17 (100)	9 (90,0)	indet	0,37
Polimicrobiana	9 (33,3)	6 (35,3)	3 (30,0)	0,91(0,50-1,65)	0,56
Co-inf <i>Acinetobacter</i>	6 (22,2)	4 (23,5)	2 (20,0)	0,92(0,48-1,79)	0,61
Co-inf <i>Pseudomonas</i>	2 (7,4)	1 (5,9)	1 (10,0)	1,28(0,31-5,27)	0,61
<i>bla</i> _{KPC} +	20 (74,1)	14 (82,4)	6 (60)	0,61(0,24-1,50)	0,20
Tratamento (%)					
Início < 12h	10 (37,0)	6 (35,3)	4 (40,0)	1,07(0,58-1,99)	0,56
Início <12 e sensível	4 (14,8)	2 (11,8)	2 (20,0)	1,30(0,46-3,63)	0,47
Início em <24h	14 (51,9)	9 (52,9)	5 (50,0)	0,95(0,53-1,91)	0,59
Início <24 e sensível	7 (25,9)	4 (23,5)	3 (30,0)	1,13(0,55-2,33)	0,52
Início entre 24-72h e sensível	5 (18,5)	3 (17,6)	2 (20,0)	1,06(0,48-2,31)	0,62
Início > 72h e sensível	11 (40,7)	8 (47,0)	3 (30,0)	0,77(0,44-1,35)	0,32
Monoterapia	8 (29,6)	7 (41,2)	1 (10,0)	0,60(0,36-0,99)	0,09
Terapia Combinada	19 (70,4)	10 (58,8)	9 (90,0)	1,66(1,00-2,74)	0,09
2 atm	4 (14,8)	2 (11,8)	2 (20,0)	1,30(0,46-3,63)	0,47
3 atm	10 (37,0)	6 (35,3)	4 (40,0)	1,07(0,58-1,99)	0,56
4 atm	5 (18,5)	2 (11,8)	3 (30,0)	1,70(0,56-5,17)	0,24
Colistina	22 (81,5)	12 (70,6)	10 (100)	1,83(1,25-2,68)	0,07
Dose ataque	17 (77,3)	8 (66,7)	9 (90,0)	1,70(0,87-3,31)	0,21
Tigeciclina	14 (51,9)	8 (47,1)	6 (60,0)	1,21(0,67-2,16)	0,40
Dose dobrada	9 (64,3)	6 (75,0)	3 (50,0)	0,60(0,18-1,93)	0,34
Carbapenem	13 (48,1)	7 (41,2)	6 (60,0)	1,32(0,72-2,42)	0,29
Aminoglicosídeo	18 (66,7)	11 (64,7)	7 (70,0)	1,09(0,60-1,96)	0,56
Sinergismo (Terapia combinada)	14 (73,7)	8 (47,0)	6 (60,0)	1,21(0,67-2,16)	0,40

RR, risco relativo; IC, intervalo de confiança; UTI, unidade de terapia intensiva; LOS, tempo de permanência; IQR, inter quartil range; Co-inf, coinfeção; Atm, antimicrobiano

Ainda no grupo de pacientes infectados por enterobactérias resistentes à polimixina, dentre os 19 que receberam terapia combinada ocorreu sinergismo pelo método “*Time kill*” em 14 (73,7%) e não houve associação do sinergismo com mortalidade (RR=1,21, IC95% 0,67-2,16, $p=0,40$). (Tabela 13).

A combinação estudada mais frequente foi a associação de polimixina, tigeciclina e amicacina em 10 pacientes (63,1%) e nesse grupo, entre os que receberam a terapia tripla (5 pacientes), sinergismo ocorreu em todos (100%), com 3 óbitos (60%) e entre os outros cinco, onde foi acrescentado carbapenêmico na prescrição, sinergismo ocorreu em 2 (40%), também com 3 óbitos (60%). Quatro (21%) receberam combinação de 2 drogas e sinergismo ocorreu em 3 (75%). (Tabela 14)

Entre os 8 pacientes que receberam monoterapia, todos apresentaram ITU e ocorreu apenas um óbito (12,5%), cujo paciente recebeu polimixina como monoterapia e com CIM 16 µg/mL. As Concentrações inibitórias Mínimas (CIM) da polimixina entre os que receberam esta droga como monoterapia variaram de 4 a 16 ug/mL .

Tabela 14- Terapia antimicrobiana utilizada por pelo menos 48 horas, óbito relacionado à infecção e presença de sinergismo em 27 pacientes com infecções por enterobactérias resistentes às polimixinas, entre março de 2011 e dezembro de 2012.

Terapia	N (%)	Sítio infecção	Óbito relacionado n (%)	Sinergismo Time Kill
Monoterapia	8 (29,6)		1 (12,5)	-
Polimixina (CIM 4-16ug/mL)	3 (11,1)	ITU	1 (33,3) (CIM=16ug/mL)	-
Amicacina	3 (11,1)	ITU	0	-
Tigeciclina (CIM 2 ug/mL)	1 (3,7)	ITU	0	-
Fosfomicina	1 (3,7)	ITU	0	-
Terapia combinada	19 (70,4)		9 (47,4)	
Poli/ami/tige	5 (18,5)	4 PN, 1 ICS	3 (60,0)	5 (100%)
Poli/ami/tige/carba	5 (18,5)	4 PN, 1 ITU	3 (60,0)	2 (40%)
Poli/ami/carba	3 (11,1)	3 PN	1 (33,3)	2 (66,6%)
Poli/carba/tige	2 (7,4)	1 ICS, 1 ITU	1 (50,0)	2 (100%)
Poli/carba	2 (7,4)	1 ITU, 1 PN	2 (100)	1 (50%)
Poli/ami	1 (3,7)	1 ITU	0	1 (100%)
Poli/tige	1 (3,7)	1 SST	0	1 (100%)
Total	27 (100)		10 (37,0)	14 (73,7%)

CIM, concentração inibitória mínima; ITU, infecção de trato urinário, PN, pneumonia, ICS, infecção de corrente sanguínea; SST, infecção de pele/partes moles; poli, polimixina; ami, amicacina; tige, tigeciclina; carba, carbapenêmico

A variação das CIM dos antimicrobianos testados nas infecções por enterobactérias resistentes às polimixinas dos 27 pacientes está na tabela 15:

Tabela 15- Variação das Concentrações Inibitórias Mínima (CIM) de polimixina, tigeciclina, amicacina e imipenem e sítios de isolamento do agente em 27 pacientes com infecções por enterobactérias resistentes à polimixina, entre março de 2011 e dezembro de 2012.

Sítio isolado	Número isolado (%)	Variação CIM Polimixina (ug/mL)	Variação CIM Tigeciclina (ug/mL)	Variação CIM Amicacina (ug/mL)	Variação CIM Imipenem (ug/mL)
Sangue	6 (22,2)	4-64	0,5-4	4-128 (3)	0,5-8
Aspirado traqueal	10 (37,0)	4-64	0,25-4	16 (4)	0,5-8
Urina	12 (44,4)	4-64	0,12-4	NR	0,5-8

CIM, concentração inibitória mínima; NR, não realizado

Na análise multivariada para avaliar fatores de risco independentes para óbito relacionado à infecção entre pacientes com infecções resistentes à polimixina, foram selecionadas todas as variáveis com $p < 0,15$, Choque (OR 27,40; IC95% 1,68-446,82; $p = 0,02$) e diálise (OR 13,26; IC95% 1,17-149,98; $p = 0,03$) foram fatores de risco independentes. (Tabela 16).

Tabela 16- Análise multivariada dos fatores associados ao óbito relacionado à infecção de 27 pacientes com infecções causadas por Enterobactérias resistentes as polimixinas, entre março de 2011 e dezembro de 2012.

Variável	Total (n=27)	Sobreviventes (n= 17)	Óbito relacionado (n= 10)	OR (IC95%)	p
Diálise	11 (40,7%)	4 (23,5%)	7 (70,0%)	13,26(1,17-149,98)	0,03
Choque	15 (55,6%)	6 (35,3%)	9 (90,0%)	27,40(1,68-440,86)	0,02

OR, odds ratio; IC, intervalo de confiança

Os gráficos 5 e 6 mostram as curvas de sinergismo pelo método *Time Kill* realizados com três e dois antimicrobianos respectivamente.

Gráficos 5- Avaliação de sinergismo entre três antimicrobianos pelo método “Time kill” em isolados resistentes à polimixina.

Kleb 901 (MIC Poli B: 8 ug/mL; MIC tige:1ug/mL; MIC amica: 16 ug/mL)

Kleb 1085- (MIC Poli B: 32 ug/mL; MIC tige: 2 ug/mL; MIC imip:8 ug/mL)

Gráfico 6- Avaliação de sinergismo entre dois antimicrobianos, pelo método “Time Kill”, em isolados resistentes à polimixina.

A figura 1, com a técnica de PFGE realizada entre os pacientes com infecções por ERC e resistentes à polimixina, nos mostra a policlonalidade destas cepas pan-resistentes. Foram identificados 5 clusters (com dois isolados cada um) e 7 isolados diferentes. Os 5 clusters foram identificados em diferentes meses nas seguintes unidades: UTI-1, UTI-2, Unidade masculina, Unidade feminina, Unidade de infectologia e UTI de queimados, aparentemente houve transmissão cruzada dos isolados 611 e 593 identificados no mesmo mês numa unidade de terapia intensiva. Com exceção da amostra 1476 e 860, todos os pacientes passaram pelas UTIs 1 e 2, que são contíguas.

Figura 1- Dendrograma dos 18 isolados resistentes à polimixina e que receberam terapia combinada, realizado pela plataforma BioNumerics®. OT 0,5 Toile 1,25

5. Discussão

Infecções por ERC tornaram-se endêmicas em várias partes do mundo em um curto período de tempo. Em 2000, apenas 1% das enterobactérias isoladas eram resistentes aos carbapenêmicos, em 2009 esse número já atingia 12,8% dos isolados de sangue, consistindo em um aumento de 4 vezes em dez anos, de acordo com NHSN, CDC (Perez *et al.*, 2013). Em Londrina, PR, Brasil, esse problema emerge em 2009 e, de maneira similar, em pouco tempo tornou-se endêmico. A enterobactéria *K. pneumoniae* é a mais prevalente em diversos estudos (Munoz-Price *et al.*, 2013), assim como encontrado em nossa casuística, em que *K.pneumoniae* foi isolada em 113 pacientes (89,0%). A presença da carbapenemase KPC foi o mecanismo de resistência mais comum, encontrada em 96 (75,6%) das enterobactérias. Outras carbapenemases, como OXA-48, NDM-1 (Nordmann *et al.*, 2011), têm sido descritas, mas não foram identificadas nos nossos isolados, assim como no nosso estudo a KPC é a que apresenta maior prevalência (Maya *et al.*, 2013; Glasner *et al.*, 2013).

Conhecer os fatores de risco associados a óbito nas infecções por enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos é fundamental, pois são infecções com alta mortalidade e fatores evitáveis podem beneficiar os pacientes. Em nosso estudo, idade superior a 60 anos e a presença de três ou mais comorbidades segundo os critérios de Charlson, foram fatores de risco apontados pela análise univariada, e, nesse caso, sem possibilidade de intervenção.

Fatores de gravidade, como infecção de trato respiratório, necessidade de diálise e presença de choque séptico também foram fatores de risco na

análise univariada. Escore APACHE II elevado na admissão (> 20 pontos), que indica pacientes com alta gravidade, e SOFA elevado na saída da UTI (> 6 pontos) foram fatores de risco entre os 98 pacientes que estiveram na UTI. Zarkotou *et al.*, 2011 e Correa *et al.*, 2013 também relataram Apache II elevado na admissão e idade como fatores de risco para mortalidade e este último autor demonstrou que diálise e uso de droga vasoativa foram fatores de risco para óbito na análise multivariada.

Nesta casuística, choque séptico foi mais frequente em pacientes na UTI e sepse em pacientes fora da UTI. Choque foi o único fator independente preditor de óbito entre os 127 pacientes estudados. No estudo de Tumbarello *et al.*, 2012, uma coorte retrospectiva multicêntrica, choque séptico, terapia inicial inadequada (após antibiograma, 60% estavam inadequados, sem sensibilidade *in vitro*) e APACHE III elevado foram preditores para óbito nas infecções de corrente sanguínea.

A resistência à polimixina em enterobactérias é um sério e crescente problema que limita mais ainda as opções terapêuticas. Em nosso estudo, essa resistência ocorreu em 27 pacientes (21,3%). Há relatos de resistência à polimixina entre enterobactérias que variam de 0,09% na Tunísia (Maalej *et al.*, 2012) a 36,1% na Itália (Capone *et al.*, 2013).

Como um dos objetivos desse estudo foi determinar os fatores de risco para resistência à polimixina entre as enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos, observamos que algumas variáveis como colonização prévia por enterobactéria e uso prévio de antimicrobianos poderiam ser fatores de risco, entretanto, apenas o uso prévio de carbapenem e de polimixina se

mostraram significantes para resistência à polimixina na análise univariada, com $p=0,03$ para cada um desses antimicrobianos.

O uso cumulativo de antimicrobianos é descrito como fator de risco para resistência aos carbapenêmicos (Patel *et al.*, 2011). A associação entre o uso prévio de polimixina e resistência a este antibiótico em isolados de enterobactérias é controverso. Nos estudos de Matthaiou *et al.*, 2008, e Kontopidou *et al.*, 2011, apenas o uso de colistina esteve associado à resistência à polimixina em isolados de enterobactérias na análise multivariada. Entretanto, Zarkotou *et al.*, 2010, em estudo de caso-controle com 52 pacientes, não encontraram nenhum fator significativo para resistência à colistina, mas constataram diferença na mortalidade hospitalar entre infectados por isolados sensíveis (35,9%) e resistentes (69,2%) à colistina, com $p=0,05$. Os autores sugerem que a resistência ocorreu em cepas de *K. pneumoniae* sensíveis com disseminação horizontal. Tóth *et al.*, 2010, em um estudo em três centros na Hungria, demonstraram que nenhum dos 8 casos de resistência à colistina havia recebido a droga previamente. Por outro lado, Hrabak *et al.*, 2011, relataram resistência *in vivo* em paciente com infecção por *K. pneumoniae* produtora de KPC-2 após uso prolongado (20 dias) de colistina. Bogdanovich *et al.*, 2011, descreveram surto de *K. pneumoniae* produtora de KPC resistente à colistina ocorrido em 5 pacientes, clone ST 258, sendo que, em três, a resistência à colistina desenvolveu-se durante o uso da droga e em dois casos essa resistência apareceu sem exposição prévia à droga. Os autores concluíram que patógenos resistentes à colistina têm o potencial de persistir nos pacientes e no ambiente e causar transmissão horizontal e que o

uso contínuo de colistina permitirá que os casos de resistência à colistina aumentem.

Em nosso estudo, apenas uso prévio de carbapenêmico foi fator de risco independente para resistência à polimixina. Os fatores de risco independentes para óbito nos pacientes com infecções por enterobactérias resistentes à polimixina foram diálise e choque, que são fatores associados à gravidade do paciente.

Ainda nesse grupo com resistência à polimixina, sinergismo avaliado entre os que receberam terapia combinada com polimixina pelo método “Time Kill” não mostrou diferença na mortalidade (RR=1,69; IC95% 0,67-2,16; $p=0,40$). Estudo multicêntrico e observacional de Capone *et al.*, 2013 demonstrou que a resistência à colistina foi fator independente para óbito, diferente de nosso achado, que não mostrou diferença entre os óbitos por isolados sensíveis (34%) e resistentes (37%), com $p=0,46$,

Outro dado que vale ressaltar é a alta frequência (43,3%) de infecções polimicrobianas encontrada na nossa casuística, sendo a maioria coinfeção por *Acinetobacter baumannii* (28,3%) e *Pseudomonas aeruginosa* (10,2%), embora esse fato não tenha impactado na mortalidade ($p=0,29$). Marchaim *et al.*, 2011, descreveram em uma coorte retrospectiva que a co-colonização por ERC e bacilos gram negativos não fermentadores foi fator de risco para mortalidade (OR 17,2; $p=0,006$), aumentando em até 10 vezes o risco de óbito; diferente do nosso dado, onde coinfeção não foi risco para óbito.

A elevada mortalidade hospitalar encontrada neste estudo (61,4%) também é relatada por outros autores. Cinco estudos que avaliaram bacteremia por *K. pneumoniae* produtora de KPC mostraram que a mortalidade variou de

39% a 82% (Zarkotou *et al.*, 2011; Kontopolou *et al.*, 2010; Tumbarello *et al.*, 2012; Qureshi *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2013; Daikos *et al.*, 2014). Em nosso estudo, óbito relacionado à infecção, ou seja, que ocorreu durante o tratamento, foi de 34,6%, semelhante ao achado de Zarkotou *et al.*, 2011 (34%), e Patel, 2008 (38%), sendo este último uma análise com infecções em vários sítios. Em uma coorte com avaliação de infecções em vários sítios de pacientes internados em UTI, Kontopidou *et al.*, 2014, encontraram mortalidade global de 51,3%, e em 14 dias, 25,2%. A taxa de mortalidade que encontramos entre os pacientes de UTI, no 14º dia, foi 29,6%. Pacientes em hospitais de agudos de longa permanência podem chegar a 70% de mortalidade (Endimiani *et al.*, 2009).

A mortalidade relacionada à infecção entre pacientes internados na UTI foi elevada (86,4%; RR 1,29; IC95%1,01-1,65, $p=0,054$). Outros estudos relataram mortalidade maior entre pacientes na UTI (59% na UTI vs 37,5% fora da UTI), (Souli *et al.*, 2010), enquanto Zarkotou *et al.*, 2011, demonstraram menor mortalidade em pacientes com bacteremia na UTI (28,9%) quando comparada com pacientes fora da UTI (46,7%), provavelmente pelo maior monitoramento na UTI.

Em recente revisão de Tzouvelekis *et al.*, 2014, a análise de 20 estudos realizados entre 2007 e 2014, confirmou que infecções por enterobactérias têm mortalidade inaceitável, o que indica que a terapia atual não é adequada e deve ser revista. Ainda nesta revisão, o uso de uma droga sensível *in vitro* não teve impacto na mortalidade quando comparada com o uso de terapia não ativa; a menor mortalidade (18,6%) foi observada entre os pacientes que receberam algum carbapenêmico no esquema terapêutico.

Ao avaliarmos monoterapia e terapia combinada, entre os 29 pacientes que receberam monoterapia (22,8%), a mortalidade hospitalar encontrada foi 24,1% (7 pacientes), a maioria (28 pacientes, 96,5%) nesse esquema terapêutico, apresentou infecção de trato urinário, o que explica o uso de uma única droga. Nesse caso, colistina foi a droga mais frequentemente usada nesse grupo.

Em um estudo com 21 infecções de trato urinário por enterobactérias produtoras de KPC, a taxa de sucesso ocorreu em 76%, com mortalidade de 19%. Entre os 21 pacientes, 7 receberam gentamicina como monoterapia, com 100% de sucesso (Alexander *et al.*, 2012). Ainda em nosso estudo, a mortalidade hospitalar entre os que receberam terapia combinada foi de 72,4%, mas nesse grupo estavam todas as pneumonias e infecções de corrente sanguínea, infecções graves em que geralmente se utilizam tratamentos associados.

Além da resistência aos carbapenêmicos, em 75,6% de nossos casos devido à produção de KPC, e da resistência às polimixinas em 21,3%, observamos que os patógenos também apresentavam resistência a outros antimicrobianos utilizados no tratamento dessas infecções, como tigeciclina (41,7% pelo Eucast, CIM $\leq$ 1ug/mL ou 7,2%, pelo FDA, CIM $\leq$ 2 ug/mL) e gentamicina (81,9%). Dados muito semelhantes foram verificados em outro estudo brasileiro, onde durante a avaliação de um surto com 33 isolados em hospital de São Paulo foram identificados 5 genótipos, com 21% de resistência à colistina, 45% de resistência à tigeciclina e à amicacina e 24% à gentamicina (Pereira *et al.*, 2013). Kontopidou *et al.*, 2014, descreveram resistências semelhantes, de 20% para colistina, 33% para tigeciclina, 21% para

gentamicina e 64% para amicacina. Zarkotou *et al.*, 2011, também demonstraram resistência superior a 20% (24,5%) à colistina e Capone *et al.*, 2013, apresentaram taxas de 36,1% de resistência à colistina.

Entretanto, diferente de outros estudos, nossos dados não mostraram diferença na mortalidade entre pacientes com infecção sensível ou resistentes à polimixina. Setenta por cento dos pacientes que utilizaram colistina receberam dose de ataque, mas não houve diferença significativa na mortalidade. Gentamicina também apresentou elevada resistência (superior a 80%) e apenas fosfomicina mostrou-se com ótimo padrão de sensibilidade, tanto pelo ponto de corte do Eucast (96,5%) como CLSI (100%). Entretanto, a apresentação intravenosa desta droga não é disponível em nosso país e apenas um paciente recebeu a apresentação oral no tratamento de infecção de trato urinário recorrente, com sucesso.

No presente estudo, tempo de início do antimicrobiano, em até 12h ou 24h e com pelo menos uma droga com sensibilidade *in vitro* não reduziu mortalidade. Patel *et al.*, 2008, em estudo de caso controle pareado, com 99 pacientes em cada braço, demonstraram que o tempo oportuno (até 48 horas) de administração de antibióticos sensíveis não foi associado à maior sobrevida em pacientes infectados por *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos, e sim, apenas à remoção do foco, como debridamentos ($p=0,002$). Semelhante também aos achados de Zarkotou *et al.*, 2011, neste caso em bacteremias, onde o início de antibiótico ativo em até três dias não apresentou diferença na sobrevida (23,5% x 16,7%). Nguyen *et al.*, 2010 corroboraram com esses achados em uma coorte retrospectiva de 48 pacientes, em que o tempo de início do antibiótico sensível *in vitro* não alterou

a mortalidade e sim, a rápida erradicação microbiológica e a erradicação do foco.

Esse dado difere dos princípios da campanha de sobrevida da sepse, em que o início do antibiótico adequado na primeira hora do diagnóstico da sepse demonstra impacto na redução de mortalidade. Entretanto, não aborda especificamente patógenos multidroga ou pan resistentes (Dellinger *et al.*, 2013). Esses dados discordantes podem ser devidos aos diferentes critérios utilizados para definir tratamento apropriado, dificultando a comparação entre os estudos.

O impacto da monoterapia e da terapia combinada na mortalidade por ERC tem sido amplamente discutido na literatura, com vários estudos a favor da terapia combinada (Souli *et al.*, 2009; Zarkotou *et al.*, 2011; Tumbarello *et al.*, 2012; Qureshi *et al.*, 2012; Kontopidou *et al.*, 2014; Daikos *et al.*, 2014; Tzouveleakis *et al.*, 2014), entretanto, não foi publicado até este momento um estudo controlado que respalde essa conduta. Revisões publicadas também corroboram a hipótese de que terapias combinadas apresentariam melhores desfechos. Lee & Burgess, 2012, numa revisão sistemática (2001-2011) sobre tratamento de infecções por KPC, encontraram 49% de falha terapêutica com monoterapia e 25% na terapia combinada ($p=0,01$), sendo que as maiores taxas de falha com a monoterapia foram nas infecções de trato respiratório ($p=0,03$). Entretanto, os autores ressaltam que, embora a terapia combinada seja recomendada, desconhece-se qual seria a melhor combinação. Outras revisões (Zavascki *et al.*, 2013) destacaram a importância da terapia combinada no tratamento das infecções por bactérias gram-negativas resistentes aos carbapenêmicos.

Em nosso estudo, a terapia combinada com duas ou três drogas, sendo pelo menos uma sensível *in vitro* e com início precoce (12 ou 24 horas), não demonstrou diferença na mortalidade. Em revisão recente de 20 estudos clínicos, Tzouveleakis *et al.*, 2014, sugeriram que o tratamento com um único agente sensível *in vitro* não apresentou mortalidade significativamente diferente da observada em pacientes tratados com terapia não ativa. Entretanto, a combinação de duas ou mais drogas ativas *in vitro* foi superior à monoterapia com evidente benefício na taxa de mortalidade nos pacientes que receberam terapia combinada ($P < 0,001$). Ainda nessa revisão, a menor mortalidade foi observada em pacientes tratados com terapia combinada com carbapenem (18,6% de mortalidade), entretanto, essa recomendação depende da CIM dos carbapenêmicos. Em nosso estudo, 12 pacientes receberam carbapenêmicos, todos com CIM de 8ug/mL e todos em terapia combinada, com duas ou três drogas, entretanto, o uso do carbapenêmico não teve impacto na mortalidade. O número pequeno de casos e os diferentes sítios de infecção da nossa casuística são importantes limitações para avaliação do uso de carbapenêmico no tratamento de ERC.

O uso de mais de um agente sensível *in vitro* não foi significativo, assim como tratamento com monoterapia ou associação de drogas, diferente de outros estudos, nos quais o uso de terapia combinada mostra menor mortalidade quando comparada com monoterapia, já citado anteriormente. Em nosso estudo, monoterapia tende a ser um fator protetor (RR 0,77; IC95% 0,60-0,98, $p=0,054$) e, na curva de Kaplan Meier, quando consideradas todas as infecções, apresenta $p=0,007$ (log rank). Entretanto, vale ressaltar que esse

achado pode ser decorrente do fato de monoterapia, utilizada em 29 pacientes, ter sido usada em 28 casos de ITU.

Capone *et al.*, 2013, descreveram 23 diferentes esquemas de tratamento em um estudo prospectivo multicêntrico com 97 pacientes e indicaram que a avaliação de muitos esquemas é um fator complicador nessas análises. Em nosso estudo, 16 esquemas foram utilizados incluindo monoterapia e combinações, de duas, três ou quatro antimicrobianos.

Entretanto, uma recente revisão conduzida por Mical Paul *et al.*, 2014, demonstrou que terapia combinada não apresentou resultados superiores quando comparada a monoterapia por colistina. O uso excessivo de antimicrobianos nos hospitais onde ERC são prevalentes resultaria num círculo vicioso entre o uso de antimicrobianos e indução ou manutenção da resistência.

No estudo de Kontopidou *et al.*, 2014, pacientes internados em UTI e que apresentaram 20% de resistência à colistina, a monoterapia foi administrada em 60,7% dos pacientes. A maioria dos pacientes apresentou infecção de corrente sanguínea e PAV. Dentre as terapias associadas, colistina com aminoglicosídeo foi a mais frequente e o uso de colistina nas diversas combinações demonstrou que o uso desta droga apresentou sucesso significativo. Esse dado difere de nossos achados, onde o uso de polimixina esteve presente em 84,2% dos tratamentos e não esteve associada a um melhor prognóstico. Em nosso estudo, entre os 107(84,2%) pacientes que receberam colistina, 69,2% receberam dose de ataque, sem significância estatística quanto à resistência à colistina (RR=1,10; IC95 0,91-1,33; p=0,25). Monoterapia, em especial com polimixina ou amicacina, ocorreu em pacientes

com infecção de trato urinário, e nestas infecções, observamos menor mortalidade, com apenas um óbito em um paciente que recebeu polimixina com CIM =16 ug/mL. Como a CIM nestes casos variou de 4 a 16 ug/mL, os dois que receberam colistina e não morreram tinham CIM = 4ug/mL, podem ter sobrevivido devido à maior concentração urinária da colistina (Nation *et al.*, 2014).

Alguns autores relatam sucesso no tratamento de infecções por *Klebsiella pneumoniae* resistente à colistina com combinações de altas doses de tigeciclina e colistina, além da associação com colistina inalada no tratamento de pneumonia (Humphries *et al.*, 2010); outro autor, Mezzatesta *et al.*, 2011, em surto com 8 pacientes por KPC-3 resistente à colistina, relata apenas um óbito ao utilizar associação de gentamicina, tigeciclina e carbapenem. O uso de dose dobrada de tigeciclina não mostrou diferença na mortalidade em nosso estudo; esse achado pode ter sido decorrente, como já citado anteriormente, da diversidade das infecções e do número de pacientes que receberam esse esquema terapêutico.

O sinergismo avaliado entre os que receberam terapia combinada com polimixina pelo método “Time Kill” não mostrou diferença na mortalidade (RR=1,69; IC95% 0,67-2,16; p=0,40). Entre os 19 pacientes infectados por ERC resistentes à polimixina e que receberam terapia combinada com duas ou três drogas, houve sinergismo em 14 (73,7%), sendo a associação de polimixina, amicacina e tigeciclina, com ou sem carbapenêmico, a associação mais frequente (52,6%). Entre os 5 pacientes que receberam a associação de polimixina, amicacina e tigeciclina, sem o carbapenem, sinergismo ocorreu em 5 (100%), 3 morreram (60%) e quando houve associação de um

carbapenêmico, em outros 5, apenas 40% de sinergismo e também com 3 óbitos (60%).

Bratu *et al.*, 2005, em estudos de “Time kill”, relatam sinergismo de polimixina B com rifampicina em 15 de 16 isolados estudados, inclusive 2 cepas resistentes à polimixina. Esses autores também encontraram sinergismo bactericida em menor proporção entre polimixina B e imipenem, em 10 de 16 testados, mas houve antagonismo em três. Nesse estudo, as cepas eram policlonais. Ainda sobre a combinação de polimixina e rifampicina ou polimixina com doxiciclina, ambas mostraram efeito sinérgico em ERC, com redução de 4 vezes a CIM de polimixina. Menor sinergismo foi encontrado entre a associação de polimixina B com tigeciclina, pelo método Checkerboard (Elemam *et al.*, 2010). Estudos de sinergismo entre polimixinas (MIC <1 ug/mL) e doripenem (CIM > 16 ug/mL) evidenciaram atividade bactericida em 4 horas, sugerindo que essa seja uma opção terapêutica (Lee & Burgess, 2013). Entretanto, testes de sinergismo entre cepas resistentes à polimixina ainda são infrequentes e em nosso estudo foi realizado apenas entre as cepas resistentes à polimixina e com as drogas utilizadas no tratamento dos pacientes. Portanto, drogas como rifampicina, doripenem e doxiciclina, que não estão disponíveis no Brasil para o tratamento de infecções por ERC, não foram testadas.

A policlonalidade em surtos por ERC tem sido citada com frequência (Bratu *et al.*, 2005; Capone *et al.*, 2013). O presente estudo evidenciou entre os 19 isolados resistentes à polimixina, cinco *clusters*, cada um com dois isolados e mais 7 isolados diferentes, demonstrando também policlonalidade dos isolados endêmicos; e que medidas voltadas para o controle do uso de antibióticos devem ser reforçadas. Não houve relação entre os *clusters* e o

sinergismo apresentado pelos isolados. Embora tenham sido coletados em diferentes unidades, todos os pacientes, exceto dois, passaram pelas UTIs que são contíguas e compartilham alguns profissionais.

Vários estudos demonstraram a policlonalidade envolvida na disseminação de ERC (Pournaras *et al.*, 2009, 2 clones; Perez *et al.*, 2010; com 2 genótipos diferentes, com *bla*_{KPC-2} e *bla*_{KPC-3}; Souli *et al.*, 2010, 4 clones diferentes; Capone *et al.*, 2013, ST 512 e ST 258; Pereira *et al.*, 2013, 5 genótipos; Fehlberg *et al.*, 2012, 2 genótipos).

Este estudo tem várias limitações, incluindo os diferentes sítios de infecção e as diferentes combinações de tratamento que dificultaram a análise dos resultados e fragmentaram os grupos.

6. Conclusões

- Infecções por ERC, atualmente endêmicas em vários países, inclusive no Brasil, apresentaram elevada mortalidade hospitalar (superior a 60%) e relacionada à infecção, (34,6%), compatível com a literatura.
- A enterobactéria mais prevalente foi *Klebsiella pneumoniae*, em 89% dos casos, e o mecanismo de resistência mais comum foi a produção da carbapenemase KPC (75,6%).
- Choque foi fator independente preditor de óbito, tanto entre os pacientes infectados por ERC como naqueles infectados por isolados resistentes à polimixina; e neste último grupo, a necessidade de tratamento dialítico também foi fator preditor de óbito. Em ambas situações, fatores de gravidade foram decisivos.
- O único fator preditor para resistência à polimixina foi o uso prévio de carbapenêmicos, ressaltando aqui a importância do uso racional de antimicrobianos na prevenção de resistência antimicrobiana. O uso de mais de um antimicrobiano sensível in vitro foi fator protetor para resistência à polimixina.
- A presença de vários clones foi encontrada neste estudo, assim como várias unidades de internação.
- Quanto ao tratamento dessas infecções, a coorte não define o início precoce (menos de 12 ou 24 horas) e empírico como benéfico no impacto da mortalidade.

- Não houve impacto em usar mais de uma droga sensível *in vitro* e há uma tendência da terapia combinada apresentar-se como fator de risco, independente se duas, três ou quatro drogas.
- Monoterapia parece ser protetora quando relacionada às infecções de trato urinário, nas quais se utilizou monoterapia em sua maioria (96,5%).

7. Anexos

Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de **03/10/2012**, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **318/12** intitulado: **“TRATAMENTO DE INFECÇÕES POR ENTEROBACTÉRIAS RESISTENTES AOS CARBAPENÊMICOS”** apresentado pelo Departamento de **MOLÉSTIAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS**

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: Sílvia Figueiredo Costa

Pesquisador (a) Executante: Claudia Carrilho

CEP-FMUSP, 04 de Outubro de 2012.

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

Anexo 2 – Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos

Universidade
Estadual de Londrina

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS
Universidade Estadual de Londrina
Registro CONEP 268

Parecer CEP/UEL: 020/2011 CAAE: 6716.0.000.268-10 Processo: 6808/2011 Folha de Rosto: 394766	Londrina, 03 de maio de 2011.
Pesquisador(a): Cláudia Maria Dantas de Maio Carrilho Unidade/Órgão: HU – Comissão de Controle de Infecção Hospitalar	
Prezado(a) Senhor(a): <p style="text-align: center;">O "Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina" (Registro CONEP 268) – de acordo com as orientações da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto:</p> <p style="text-align: center;">"Tratamento de Pacientes com Infecções por Enterobactérias Resistentes aos Carbapenems"</p>	
Emenda: Inclusão de alterações no Título, Objetivo Principal, Delineamento do Estudo, Recomendações de Tratamento e Fluxograma.	
Situação do Projeto: APROVADO Informamos que deverá ser comunicada, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da pesquisa, bem como deverá apresentar ao CEP/UEL relatório final da pesquisa.	
Atenciosamente, Profa. Dra. Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos Universidade Estadual de Londrina	

Campus Universidade Estadual de Londrina - Caixa Postal 6001 - Fone (043) 335-1000 - Fax (043) 335-1001 - CEP 86051-900 - Internet: <http://www.uel.br>
 Hospital Universitário/Centro de Ciências da Saúde: Av. Robert Koch, 400 - Via Docência - Fone (043) 335-1000 FAX: (043) 335-1001 - CEP 86051-900

LONDRINA PARANÁ BRASIL

Form. Cad. 15/14 - Impressão 04/2002/01/01

Anexo 3 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Titulo da pesquisa:

“Tratamento de infecções por Enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos”

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo a participar da pesquisa **“Tratamento de infecções por Enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos”** realizada no “Hospital Universitário de Londrina-PR”. O objetivo da pesquisa é “ Conhecer a resposta clínica e bacteriológica dos pacientes infectados por Enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos ao tratamento instituído; determinar a incidência de Enterobactérias resistentes a carbapenêmicos de isolados clínicos de pacientes internados no Hospital Universitário de Londrina, avaliar o perfil de sensibilidade a antimicrobianos destas Enterobactérias; pesquisar os mecanismos de resistência das Enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos isoladas de materiais clínicos; conhecer a mortalidade dos pacientes com infecções por Enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos e os fatores de risco para morte nos pacientes com infecções por Enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos” . A sua participação é muito importante e ela se daria da seguinte forma: ao ser detectada alguma infecção por uma Enterobactéria resistente aos carbapenêmicos durante sua internação no hospital, iniciar o tratamento com antimicrobianos conhecidamente indicados para esta infecção e acompanhar o resultado do tratamento através de sinais e sintomas clínicos e laboratoriais (exames de sangue, radiografias de tórax, exames de urina, conforme a necessidade). Gostaríamos de esclarecer que sua participação é totalmente voluntária, podendo você: recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Informamos ainda que as informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade.

Os materiais biológicos utilizados (sangue, urina, secreções) serão utilizados para conhecer o patógeno, sua sensibilidade aos antimicrobianos e biologia molecular para estudo detalhado da bactéria, que serão realizados no laboratório do HUL e do Hospital das Clínicas da FMUSP-SP.

Os benefícios esperados são a instituição imediata do tratamento antibiótico indicado para esta infecção e avaliar o resultado deste tratamento adequado. Os riscos existentes são aqueles inerentes aos pacientes com infecções graves por Enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos, ou seja, ausência de resposta clínica e laboratorial.

Informamos que o senhor não pagará nem será remunerado por sua participação. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente de sua participação na pesquisa.

Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos pode nos contactar - **Cláudia Maria Dantas de Maio Carrilho, Hospital Universitário de Londrina - Fone 33712353** ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, na Avenida Robert Kock, nº 60, ou no telefone 3371 – 2490. Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas, devidamente preenchida e assinada entregue a você.

Londrina, ____ de _____ de 2011.

Pesquisador Responsável

RG::_____

_____ (nome por extenso do sujeito de pesquisa),
tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em
participar **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

Assinatura (ou impressão dactiloscópica):_____

Data:_____

Obs: Caso o participante da pesquisa seja menor de idade, deve ser incluído o campo para assinatura do menor e do responsável.

Anexo 4 – Ficha de Coleta de Dados**FICHA DE COLETA DE DADOS****Infecções por Enterobactérias produtoras de carbapenemase**

Nº _____ RG: _____ HOSPITAL: _____
NOME: _____
SEXO: FEM [] MASC []
IDADE: _____ anos.
DATA DE INTERNAÇÃO HOSPITALAR: ____/____/____ UNIDADE: _____
DATA DE INTERNAÇÃO NA UTI: ____/____/____

DOENÇA DE BASE

D. RESPIRATÓRIA [] D. CARDIOVASCULAR [] NEO HEMATOLÓGICA []
TUMOR DE ORGÃO SÓLIDO [] D. INFECCIOSA [] IR CRÔNICA []
D.CEREBROVASCULAR [] DM [] POLITRAUMA [] QUEIMADURA []
HIV/AIDS [] HEPATOPATIA [] TRANSPLANTE [] OUTRA ()
FEBRE:
PCR (proteína C reativa): _____

SITIO INFECÇÃO HOSPITALAR:

[] ICS [] Pneumonia [] Abdominal [] ITU [] partes moles []
outros _____
Retirada CVC SIM [] NÃO [] Data: ____/____/____
Foco erradicável SIM [] NÃO []
Procedimento cirúrgico: SIM [] NÃO [] Data: ____/____/____

DATA DA PRIMEIRA CULTURA: ____/____/____.

MATERIAL: _____

SENSIBILIDADE: _____

CIM polimixina: _____

CIM Tigeciclina: _____

CIM aminoglicosídeo: _____

CIM imipenem: _____

CIM Meropenem: _____

Mecanismo de Resistência: PCR KPC (+): SIM [] NÃO []

INFECÇÃO POLIMICROBIANA [] DEMAIS AGENTES:

ESTADO CLINICO

SEPSE: SIM ☐ NÃO ☐ SEPSE GRAVE: SIM () NÃO ()CHOQUE SEPTICO: ☐ SIM NÃO ☐SOFA: ☐ APACHE: () CHARLSON: ()

TRATAMENTO

ANTIBIÓTICO USADO PARA O TRATAMENTO DA INFECÇÃO

POLIMIXINA ()

TIGECICLINA ()

AMG ()

POLI + AMG + CARBAPENEM ()

POLI + AMG + TIGE ()

OUTRO: ☐

DATA DE INICIO DO TRATAMENTO: ____/____/____.

DATA DE FINALIZAÇÃO DO TRATAMENTO: ____/____/____.

DURAÇÃO DO TRATAMENTO: _____DIAS

ANTIBIÓTICO APROPRIADO: SIM ☐ NÃO ☐☐ Dose inadequada☐ Início inadequado: Início horas após coleta: _____☐ Tempo de tratamento inadequado: Dias: _____PERSISTÊNCIA DA INFECÇÃO: SIM ☐ NÃO ☐Novo isolamento do agente: SIM ☐ NÃO ☐Sítio do isolamento: ☐ sangue ☐ urina ☐ partes moles ☐ coleção abdominal

Tempo de tratamento até novo isolamento: _____

DESFECHO: ALTA () ÓBITO () DATA: ____/____/____

TEMPO DE INTERNAÇÃO: _____DIAS

Resultado necropsia causa do óbito: _____

8. Referências Bibliográficas

1. Adler A, Carmeli Y. Dissemination of the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in the health care settings: tracking the trails of an elusive offender. *MBio* 2011; 2(6):10,1128;mBio.00280,11
2. Alexander BT, Marschall J, Tibbets RJ et al. Treatment and clinical outcomes of urinary tract infections caused by KPC-producing *enterobacteriaceae* in a retrospective cohort. *Clin Therapeutics* 2012;34(6):1314-23.
3. Almeida AC, Cavalcanti FL, Martins WM et al. First description of KPC-2-producing *Klebsiella oxytoca* in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57(8):4077-8.
4. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1980; 289(1036):321-31.
5. Antoniadou A, Kontopidou F, Poulakou G et al. Colistin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* emerging in intensive care units patients: first report of a multiclonal clusters. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59(4):786-90.
6. ANVISA. Nota técnica 01/2010, Medidas para identificação, prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde por microrganismos multirresistentes. Brasil, 2010.
7. ANVISA. Nota técnica 01/2013, Medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multirresistentes. Brasil, 2013.
8. Arnold RS, Thom KA, Sharma S et al. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *South Med J* 2011; 104(1) :40-5
9. Arruda EA, Marinho IS, Boulos M et al. Nosocomial infections caused by Multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Cont Hosp Epidemiol* 1999 ; 20(9) :620-3.
10. Bennett JW, Mendes K, Herrera ML et al. Mechanisms of carbapenem resistance among a collection of *enterobacteriaceae* clinical isolates in a Texas city. *Diagn Microbiol Dis* 2010 ;66(4) :445-8.

11. Bergamasco MD, Barroso Barbosa M, de Oliveira Garcia D et al. Infection with *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae* in solid organ transplantation. *Transplant Infect Dis* 2012 ;14(2) :198-205.
12. Bogdanovich T, Adams-Haduch JA, Tian GB et al. Colistin resistant *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Klebsiella pneumoniae* belonging to the international epidemic clone ST 258, *Clin Infect Dis* 2011; 53(4): 363-76.
13. Bradford PA, Bratu C, Urban M et al. Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 beta-lactases in New York City. *Clin Infect Dis* 2004; 39:55-60.
14. Bratu S, Landman D, Haag R et al. Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium. *Arch Intern Med*. 2005; 165(12): 1430-1435.
15. Bratu S, Tolaney P, Karamudi U et al. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY: molecular epidemiology and in vitro activity of polymyxin B and other agents. *J. Antimicrob Chemother* 2005; 56:128-32.
16. Bulik C C, Nicolau DP. Double-carbapenem therapy for carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55(6):3002-3004.
17. Bush K. Characterization of Beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;33(3):259-63.
18. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1211-33.
19. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:969-76.
20. Capone A, Giannella M, Fortini D et al. High rate of colistin resistance among patients with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection accounts for an excess of mortality. *Clin Microbiol Infect* 2013; 19:23-30.

21. Carmeli Y, Akova M, Cornaglia G et al. Controlling the spread of carbapenemase-producing gram-negatives: therapeutic approach and infection control. *Clin Microbiol Infect* 2010;16(2):102-11.
22. Castanheira M, Sader HS, Deshoande LM et al. Antimicrobial activities of tigecycline and other broad-spectrum antimicrobials tested against serine carbapenemase and metallo β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008; 52:570-73.
23. Ceccarelli G, Falconi M, Giordano A. Succesfull ertapenem-doripenem combination treatment of bacteremic ventilator associated pneumonia due to colistin resistant KPC-producing *K. pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57(6):2900-901.
24. Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chronic Dis* 1987; 40:373-383.
25. Chen Y., Zhou Z., Jiang Y. & Yu Y.(2011). Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in China. *J Antimicrob Chemother* 2011;66: 1255-9
26. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement, M100-S12, Wayne (PA): CLSI; 2005.
27. Clinical Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement, M100-S15, Wayne (PA): CLSI; 2005.
28. Clinical Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Nineteenth Informational Supplement, M100-S20, Wayne (PA): CLSI; 2012.
29. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M100-S23 2013;33(1)

30. Chang MR, Biberg CA, Lopes FA et al. The first report of infection with *Klebsiella pneumoniae* carrying the bla(KPC) gene in State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2013; 46(1):114-5.
31. Centers for Disease Control and Prevention. Guidance for Control of Infections with Carbapenem-Resistant or Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in Acute Care Facilities. *MMWR* 2009;58:256-60.
32. Centers for Disease Control and Prevention. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* associated with a long-term care facility west Virginia, 2009-2011, *MMWR* 2011;60:1418-20.
33. Centers for Disease Control and Prevention. Guidance for Control of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. CRE Toolkit 2012.
34. Coyne S, Courvalin P, Périchon B. Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55(3):947-53.
35. Crusio R, Rao S, Changawala N et al. Epidemiology and outcome of infections with carbapenem-resistant gram-negative bacteria treated with polymyxin B-based combination therapy. *Scandin J Infect Dis* 2013; 46(1):1-8.
36. Daikos GL, Markogiannakis A. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: When might we still consider treating with carbapenem? *Clin Microbiol Infect* 2011;17:1135-41.
37. Daikos GL, Tsaousi S, Tzouveleakis S et al. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections: lowering mortality by antibiotic combination schemes and the role of carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58(4): 2322-8.
38. Dalfino L, Puntillo F, Mosca A et al. High-dose, extended-interval colistin administration in critically ill patients: is this the right dosing strategy? A preliminary study. *Clin. Infect Dis* 2012;54:1720-26.
39. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012, *Intensive Care Med* 2013; 39(2):165-228.
40. Diekema DJ, Pfaller MA. Infection control epidemiology and clinical microbiology. In: Manual of Clinical Microbiology By Murray PR, Baron

- EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. 9 ed. American Society for Microbiology – ASM, Washington, DC, 2007; 1: 698-715.
41. Doi Y, Ghilardi AC, Adams J et al. High prevalence of metallo-beta-lactamase and 16S rRNA methylase coproduction among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51(9):3388-90.
 42. Dubrovskaya Y, Chen TY, Scipione MR et al. Risk factors for treatment failure of polymyxin B monotherapy for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57(11):5394-97.
 43. Elemam A, Rahimian J, Mandell W. Infection with pan-resistant *Klebsiella pneumoniae*: a report of 2 cases and a brief review of the literature. *Clin Infect Dis* 2009; 49:271-74.
 44. Elemam A, Rahimian J, Doymaz M. In vitro evaluation of antibiotic synergy for polymyxin B-resistant carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae*. *J. Clin Microbiol* 2010; 48(10):3558-62.
 45. Endimiani A, De Pasquale JM, Forero et al. Emergence of *bla*_{KPC}-containing *klebsiella pneumoniae* in a long-term acute care hospital: A new challenge to our healthcare system. *J. Antimicrob Chemother* 2009;64(5):1102-10.
 46. Endimiani A, Patel G, Hujer KM et al. In vitro activity of fosfomycin against *bla*_{KPC} containing *Klebsiella pneumoniae* isolates, including those nonsusceptible to tigecycline and/or colistin. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54(1):526-29.
 47. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (Eucast). 2012
 48. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (Eucast). 2013
 49. Evren E, Azap OK, Çolakoglu S, Arslan H. In vitro activity of fosfomycin in combination with imipenem, meropenem, colistin and tigecyclin against Oxa 48-positive *Klebsiella pneumoniae* strains. *Diag Microbiol Infect Dis* 2013; 76(3):335-8.

50. Falagas ME, Kastoris AC, Kapaskelis AM et al. Fosfomycin for the treatment of multidrug-resistant, including extended-spectrum β -lactamase producing, *Enterobacteriaceae* infections: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 2010;10(1):43-50.
51. Falagas M, Lourida P, Poulidakos P et al. Antibiotic treatment of infections due to carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: systematic evaluation of the available evidence. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58(2):654-63.
52. Fehlberg LC, Carvalho AM, Campana EH et al. Emergence of *Klebsiella pneumoniae*-producing KPC-2 carbapenemase in Paraíba, northeastern Brazil. *Braz J Infect Dis* 2012;16(6):577-80.
53. Florent A, Chichmanian RM, Cua E et al. Adverse events associated with intravenous fosfomycin. *Int J Antimicrob Agents* 2011;37(1):82-83.
54. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC Definitions for Nosocomial Infections. *Am J Infect Control* 1988; 16:128-40.
55. Garonzik SM, Li J, Thamlikitkul DL et al. Population Pharmacokinetics of Colistin methanesulfonate and formed colistin in critically ill patients from a multicenter study provide dosing suggestions for various categories of patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55(7):3284-94.
56. Gasink LB, Edelstein PH, Lautenbach E et al. Risk factors and clinical impact of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing K. pneumonia. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2009;30(12):1180-5.
57. Giamarellou H, Galani L, Baziaka F, Garaikos I. Effectiveness of a double-carbapenem regimen for infections in humans due to carbapenemase-producing pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57(5):2388-90.
58. Glasner C, Albiger B, Buist G et al. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe: a survey among national experts from 39 countries, February 2013, *Euro surveill* 2013;18(29):pii 25525.
59. Grundmann H, Livermore DM, Giske CK et al. Carbapenem non-susceptible *Enterobacteriaceae* in Europe: conclusions from a meeting of a national experts. *Euro surveill* 2010;15(47):pii 19726.

-
60. Hancock RE. Peptide antibiotics. *Lancet* 1997; 349:418-422.
 61. Hanson ND; Thomson KS; Moland ES et al. Molecular characterization of a multiply resistant *Klebsiella pneumoniae* encoding ESBLs and a plasmid-mediated AmpC. *J Antimicrob Chemother* 1990; 44:377-380.
 62. Hawley JS, Murray CK, Joergensen JH. Colistin heteroresistance in *Acinetobacter baumannii* and its association with previous colistina therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:351-2.
 63. Hirsch EB, Tam VH. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. *J Antimicrob Chemother* 2010;65(6):1119-25.
 64. Hirsch EB, Chang KT, Lasco TM et al. Emergence of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Texas. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011;69(2):234-5.
 65. Horan T, Andrus M, Dudeck MA. CDC/NHSN surveillance definition of health care associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *Am J Infect Control* 2008; 36:309-32.
 66. Hrabák J, Niemczyková J, Chudacková E et al. KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from a Czech patient previously hospitalized in Greece and in vivo selection of colistin resistance. *Folia Microbiol (Praha)* 2011; 56(4): 361-5.
 67. Humphries RM, Keledesis T, Bard JD et al. Successful treatment of pan-resistant *Klebsiella pneumoniae* pneumonia and bacteraemia with a combination of high dose tigecycline and colistin. *J Med Microbiol* 2010;59:1383-86.
 68. Ishi J, Nakae T. Lipopolysaccharide promoted opening of the porin channel. *FEBS*. 1993; 320: 251-255.
 69. Jacoby GA. AmpC Beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2009;22(1):161-82.
 70. Jácome PRLA, Alves, LR, Cabral AB et al. First report of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Brasil. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56(9):4990.

71. Knauss WA, Zimmerman JE, Wagner DP, Draper EA, Lawrence DE: APACHE Acute Physiologic and Chronic Health Evaluation: a Physiologically based classification system. *Crit Care Med* 1981, 9: 591-597.
72. Kochar S; Sheard T; Sharma R et al. Success of an Infection Control program to reduce the spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2009; 30:409-414.
73. Kontopolou K, Protonotariou E, Vasilakos K et al. Hospital outbreak caused by *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-2 β -lactamase resistant to colistin. *J Hosp Infect* 2010; 76:70-3.
74. Kontopidou F, Plachouras D, Papadomichelakis E et al. Colonisation and infection by colistin resistant gram negative bacteria in a cohort of critically ill patients. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17(11):E9-E11.
75. Kontopidou F, Giamarellou H, Katerelos P et al. Infectious caused by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* among patients in intensive care in Greece: a multi-centre study on clinical outcome and therapeutic options. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20(2):117-23.
76. Kumar A, Schweizer HP. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005;57(10):1486-513.
77. Lee GC, Burgess DS. Treatment of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) infections: a review of published case series and case reports. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2012; 11:32-40.
78. Lee GC, Burgess DS. Polymyxins and doripenem combinations against KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Med Res* 2013; 5(2):97-100.
79. Lee GC, Lawson KA, Burgess DS. Clinical epidemiology of carbapenem resistant enterobacteriaceae in community hospitals: a case case control study. *Ann Pharmacother* 2013;47(9):1115-21.
80. Lee G. Epidemiology and treatment of KPCs. What is the news. *Pharmacotherapy Rounds* 2012:3-22.
81. Lee J, Jenkins SG. Decreased susceptibility to polymyxin B during treatment for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection. *J Clin Microbiol* 2009; 47(5):1611-12.

-
82. Levin AS, Barone AA, Penço J et al. Intravenous colistin as therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Clin Infect Dis* 1999; 28:1008-11.
 83. Levy MM, Fink MP, Marshall JC. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International sepsis definitions conference. *Crit Care Med* 2003; 31(4):1250-56.
 84. Li J, Nation RL, Milne RW et al. Evaluation of colistina as an agent against multi-resistant gram-negative bacteria. *Int J Antimicrob Agent* 2005;25:11-25.
 85. Li J, Rayner CR, Nation RL et al. Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:2946-50.
 86. Livermore DM. β -lactamase in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8(4):557-84.
 87. Livermore DM. The impact of carbapenemases on antimicrobial development and therapy. *Curr Opin Investig Drugs* 2002;3(2):218-24.
 88. Maalej M, Meziou R, Mahjoubi F, Hammami A. Epidemiological study of *Enterobacteriaceae* resistant to colistin in Sfax (Tunisia). *Medecine et Maladies Infectieuses* 2012; 42(6):256-63.
 89. Mammina C, Bonura C, Di Bernardo F et al. Ongoing spread of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* in different wards of an acute general hospital, Italy, June to December 2011, Euro Surveill 2012;17(33):20248.
 90. Marchaim D, Chopra T, Perez F et al. Outcomes and genetic relatedness of carbapenem-resistant *enterobacteriaceae* at Detroit Medical Center. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2011;32(9):861-71.
 91. Marra AR, Wey SB, Castelo A et al. Nosocomial bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae*: impact of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) production on clinical outcome in a hospital with high ESBL prevalence. *BMC Infect Dis* 2006;14:6-24.
 92. Martins ST, Moreira M, Furtado GHC et al. Application of control measures for infections caused by multi-resistant gram-negative bacteria

- in intensive care unit patients. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2004; 99(3):331-334.
93. Matthaiou DK, Michalopoulos A, Rafailidis PI et al. Risk factors associated with the isolation of colistin-resistant gram-negative bacteria: a matched case-control study. *Crit Care Med* 2008; 36(3):807-11.
94. Maya JJ, Ruiz SJ, Blanco VM et al. Current status of carbapenemase in Latin America. *Expert rev anti infect ther* 2013;11(7):657-67.
95. Meletis G, Tzampaz E, Sianou E et al. Colistin heteroresistance in carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 2011;66(4):946-7.
96. Mezzatesta ML, Gona F, Caio C et al. Outbreak of KPC-3-producing and colistin-resistant, *Klebsiella pneumoniae* infections in two Sicilian Hospitals. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17 (9):1444-47.
97. Michalopoulos A, Virtzili S, Rafailidis P et al. Intravenous fosfomycin for the treatment of nosocomial infections caused by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in critically ill patients: a prospective evaluation. *Clin Microbiol Infect* 2010;16(2):184-86.
98. Monteiro J, Santos AF, Asensi MD, Peirano G, Gales AC. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:333-334.
99. Monteiro J, Widen RH, Pignatari ACC. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real time PCR. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:907-909.
100. Mohamed AF, Karaiskos I, Plachouras D et al. Application of a loading dose of colistin methanesulfonate in critically ill patients: population pharmacokinetics, protein binding and prediction of bacterial kill. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56(8):4241-49.
101. Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis* 2013; 13:785-96.
102. Nadkarni AS, Schliep T, Khan L et al. Cluster of bloodstream infections caused by KPC-2 carbapenemase-producing *klebsiella pneumonia* in Manhattan. *Am J Infect Control* 2009; 37(2):121-6.

103. Nation R, Velkov T, Li J. Colistin and polymyxin B: peas in a pod or chalk and cheese? *Clin Infect Dis* 2014; 59(10):88-94.
104. Neuner EA, Yeh JY, Hall GS et al. Treatment and outcomes in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. *Diagn Microbiol Dis* 2011;69(4):357-62.
105. Neuner EA, Sekeres J, Hall GS, van Duin D. Experience with Fosfomycin for treatment of urinary tract infections due to multidrug-resistant organisms. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56(11): 5744-48.
106. Nguyen M, Eschenauer GA, Bryan M et al. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: factors correlated with clinical and microbiologic outcomes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010; 67(2):180-4.
107. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis* 2009; 9(4):228-36.
108. Nordmann P, Poirel L, Walsh TR, Livermore DL. The emerging NDM carbapenemases. *Trends in microbiology* 2011;19(12):588-95.
109. Patel G, Huprikar S, Factor SH et al. Outcomes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection and the impact of antimicrobial and adjunctive therapies. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008;29(12):1099-106.
110. Patel N, Harrington S, Dihmess A et al. Clinical epidemiology of carbapenem-intermediate or resistant *enterobacteriaceae*. *J. Antimicrob Chemother* 2011;66:1600-08.
111. Paul M, Carmeli Y, Durante-Mangoni E et al. Combination therapy for carbapenem-resistant gram negative bacteria. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69:2305-9.
112. Perdigão-Neto, Oliveira MS, Rizek CF et al. Susceptibility of multiresistant gram-negative bacteria to fosfomycin and performance of different susceptibility testing methods. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58(3):1763-67.
113. Pereira GH, Garcia DO, Mostardeiro M et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: two years epidemiology follow up in a tertiary hospital. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2013;108(1):113-115.

114. Perez F, Endimiani A, Ray AJ et al. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* across a hospital system: impact of post-acute care facilities on dissemination. *J. Antimicrob Chemother* 2010; 65:1807-18.
115. Perez F, van Duim D. Carbapenem-resistant *enterobacteriaceae*: a menace to our most vulnerable patients. *Cleveland Clinic J Medicine* 2013;80(4):225-33.
116. Petersen PJ, Labthavikul P, Jones CH, Bradford PA. In vitro antibacterial activities of tigecycline in combination with other antimicrobial agents determined by checkerboard and time-kill kinetic analysis. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57:573-76.
117. Petrosillo N, Giannella M, Lewis R, Viale P. Treatment of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2013;11(2):159-77.
118. Pfaller, MA. Chromosomal restriction fragment analysis by pulsed-field gel electrophoresis. In: Iseberg HD, ed. Clinical microbiology procedures handbook. Washington: American Society for Microbiology, 1993.
119. Poudyal A, Howden BP, Bell JM et al. In vitro pharmacodynamics of colistin against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62:1311-18.
120. Pournaras S, Protonotariou E, Voulgari E et al. Clonal spread of KPC-2 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece. *J Antimicrob Chemother* 2009;64:348-52.
121. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(3):440-458.
122. Qureshi Z A, Paterson DL, Potoski BA et al. Treatment outcome of bacteremia due to KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: superiority of combination antimicrobial regimens. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56(4):2008-13.
123. Rasmussen BA, Bush K. Carbapenem-hydrolyzing β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41(2):223-232.

124. Ribeiro VB, Andrade LN, Linhares AR et al. Molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing isolates in southern Brazil. *J Med Microbiol* 2013; 62:1721-7.
125. Rizek C, Fu L, Dos Santos LC et al. Characterization of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates, carrying multiple genes coding for their antibiotic resistance. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2014; 13:43.
126. Rodríguez-Bana J, Alcalá JC, Cisneros JM, et al. Community infections caused by extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli*. *Arch Intern Med* 2008; 168(17):1897-1902.
127. Rossolini GM. Acquired Metallo- β -lactamases: an increasing clinical threat. *Clin Infect Dis* 2005; 41:1557-8.
128. Sandri AM, Landersdorfer CB, Jacob J et al. Population Pharmacokinetics of intravenous polymyxin B in critically patients: implications for selection of dosage regimens. *Clin Infect Dis*, 2013;57(4):524-31.
129. Satlin MJ, Kubin CJ, Blumenthal JS et al. Comparative effectiveness of aminoglycosides, polymyxin B and tigecycline for clearance of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* from urine. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55(12):5893-9.
130. Sbrana F, Malacarne P, Viaggi B et al. Carbapenem-sparing antibiotic regimens for infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* in intensive care unit. *Clin Infect Dis* 2013; 56(5):697-700.
131. Schwaber MJ, Klarfeld-Lidji S, Navon-Venezia S, Schwartz D, Leavitt A, Carmeli Y. Predictors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* acquisition among hospitalized adults and effect of acquisition on mortality. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52(3):1028-1033.
132. Schwaber MJ, Lev B, Israeli A et al. Containment of a country-wide outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Israeli hospitals via a nationally implemented intervention. *Clin Infect Dis* 2011;52(7):848-55.
133. Sheng WH, Wang JT, Li SY et al. Comparative in vitro antimicrobial susceptibilities and synergistic activities of antimicrobial combinations

- against carbapenem-resistant *Acinetobacter* species: *Acinetobacter baumannii* versus *Acinetobacter* genospecies 3 and 13TU. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; 70:380-86.
134. Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L and The Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee 2007; Guideline for isolations precautions: preventing transmission of infectious agents in healthcare settings.
135. Silva J, Aguilar C, Ayala G et al. TLA-1, a New Plasmid-Mediated-Extended-Spectrum β -lactamase from *Escheria coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44(4):997-1003.
136. Superti SV; Augustini G; Zavascki AP. Risk factors for and mortality of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* nosocomial bloodstream infections. *Rev Inst Med Trop* 2009; 51(4):211-216.
137. Souli M, Rekatsina PD, Chrysosouli Z et al. Does the activity of the combination of the imipenem and colistin in vitro exceed the problem of resistance in metallo- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53(5):2133-35.
138. Souli M, Galani I, Antoniadou A et al. An outbreak of infection due to β -lactamase *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase 2-producing *K. pneumoniae* in a Greek university hospital. *Clin Infect Dis* 2010;50:364-73.
139. Tam VH, Chang KT, La Rocco MT. Prevalence, mechanisms, and risk factors of carbapenem resistance in bloodstream isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007;58(3):309-14.
140. Tamma PD, Cosgrove S E, Maragakis LL. Combination therapy for treatment of infections with gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Rev* 2012; 25(3):450-70.
141. Tenover FC. Development and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents: an overview. *Clin Infect Dis* 2001;33(3):108-15.
142. Tóth A, Damjanova I, Puskás E et al. Emergence of a colistin-resistant KPC-2 producing *K. pneumoniae* ST 258 clone in Hungary. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010; 29:765-69.

143. Tumbarello M, Viale P, Viscoli C. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: importance of combination therapy. *Clin Infect Dis* 2012; 55(7):943-50.
144. Tzouvelekis LS, Markogiannakis A, Piperaki E et al. Treating infections caused by carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20:862-72.
145. Van Duim D, Kaye KS, Neuner EA, Bonomo RA. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: a review of treatment and outcomes. *Diag Microbiol Infect Dis* 2013;75:115-20.
146. Vila J, Martí S, Sánchez-Céspedes J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*. 2007 Jun;59(6):1210-5.
147. Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Medonça A, Bruing H, Reinhart CK, Suter PM, Thijs LG: The SOFA (Sepsis – related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the working Group on Sepsis – Related Problems of European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med* 1996, 22:707-710.
148. Yigit H, Queenan AM, Anderson GD et al. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(4):1151-61.
149. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP and Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 2004; 39:309-317.
150. Zarkotou O, Pournaras S, Voulgari E et al. Risk factors and outcome associated with acquisition of colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: a matched case-control study. *J Clin Microbiol* 2010;48:2271-4.
151. Zarkotou O, Pournaras S, Tselioti P et al. Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* and impact of appropriate antimicrobial treatment. *Clin Microbiol Infect* 2011;17:1798-1803.

152. Zavascki AP, Machado AB, de Oliveira KR et al. KPC-2 producing *Enterobacter cloacae* in two cities from Southern Brazil. *Int J Antimicrob Agents* 2009;34(3):286-8.
153. Zavascki AP, Bulitta JB, Landersdorfer CB. Combination therapy for carbapenem-resistant gram-negative bacteria. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2013; 11(12):1333-53.