JESSICA FERNANDES RAMOS

**Avaliação da presença de sinergismo antimicrobiano *in vitro*
contra isolados de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a
carbapenêmicos obtidos em hemoculturas de pacientes
submetidos a transplante de células precursoras
hematopoiéticas**

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
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Ramos, Jessica Fernandes

Avaliação da presença de sinergismo antimicrobiano
in vitro contra isolados de *Pseudomonas aeruginosa*
resistentes a carbapenêmicos obtidos em
hemoculturas de pacientes submetidos a transplante
de células precursoras hematopoiéticas / Jessica
Fernandes Ramos. -- São Paulo, 2018.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.
Orientadora: Silvia Figueiredo Costa.

Descritores: 1.*Pseudomonas aeruginosa*
2.Sinergismo farmacológico 3.Resistência a múltiplos
medicamentos 4.Carbapenêmicos 5.Colistina
6.Transplante

USP/FM/DBD-134/18

Responsável: Kátia Maria Bruno Ferreira - CRB-8/6008

Dedicatória

Aos pacientes queridos e determinados que tive o privilégio de conhecer ao longo dos últimos anos cuidando de pessoas que necessitaram de transplante de célula-tronco hematopoiética

Em especial à memória de Isabela, Marcelo, José e Nair

Agradecimentos

À minha orientadora, professora **Sílvia** Figueiredo Costa, pela paciência e pela inspiração ao unir como poucos dedicação com excelência ao ensino, à assistência e à pesquisa

À todos do Laboratório de Investigação Médica de Bacteriologia (LIM -54). Em especial à Dra. **Gleice** por seus incansáveis ensaios e sua organização. À **Camila, Patrícia e Roberta**: aprendi e aprendo muito com vocês e à querida secretária **Andreia**

À Banca de Qualificação: Dr. **Guilherme** Furtado, Dr. **Jorge** Luiz Sampaio e Dra. **Paola** Cappellano pelas preciosas observações, sugestões e gentileza do tempo dispensado a esse trabalho

À pós-graduação do Departamento de Moléstias Infecciosas, em especial à secretárias **Roseli e Luíza**

À CCIH do Instituto Central do HCFMUSP, **Dra. Thais e Fernanda**

Aos colegas hematologistas minha admiração e gratidão por compartilharem tanto. Em especial ao professor **Vanderson** e equipes médica, de enfermagem e da farmácia do Hospital das Clínicas e do Hospital Sírion-ibanês

Aos colegas e amigos pela ausência ao longo do desenvolvimento desta tarefa, especialmente **Adriana, Alice, Fabiana, Vivian e Esper**

À minha irmã **Jamile** pelo apoio e incentivo e à vovó **Nina** pelos sábios conselhos

Aos meus pais queridos **Doni e Rose**, meus primeiros professores, mestres de tantos e exemplos de dedicação ao estudo e ao trabalho

Aos meus amores **Otto e Maria Laura**: paz, aconchego e alegria sem iguais!

A **Deus** pelo dom da vida

"O sucesso é ir de fracasso em fracasso sem perder o
entusiasmo"

(Winston Churchill)

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 Journal 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 List of Journals Indexed in Index Medicus.

Sumário

Lista de Abreviaturas e símbolos	
Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Lista de gráficos	
Lista de quadros	
Resumo	
Abstract	
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Transplante de células precursoras hematopoiéticas e infecções...	02
1.2 Produção de enzimas.....	18
1.3 Alteração da permeabilidade da membrana externa.....	19
1.4 Efluxo do antimicrobiano.....	20
1.5 Alteração do sítio de ligação da droga.....	21
1.6 Terapia combinada e sinergismo <i>in vitro</i>	22
1.7 Sinergismo de antimicrobianos.....	24
1.8 Método do tabuleiro ou <i>checkerboard</i>	26
1.9 Método de curva de morte microbiana ou <i>time-kill</i>	27
1.10 Sinergismo Antimicrobiano e <i>P. aeruginosa</i>	28
1.11 Fatores de virulência da <i>P. aeruginosa</i>	29
1.12 Sequenciamento do genoma total bacteriano.....	31
1.13 Justificativa do estudo.....	33
2. OBJETIVOS.....	35
2.1 Objetivo primários.....	36
2.2 Objetivos secundários.....	36
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
3.1 Características do Hospital e da população do estudo.....	38
3.2 Delineamento do Estudo.....	38
3.3 População do Estudo.....	38
3.4 Definições.....	39
3.5 Dados clínicos.....	39
3.6 Dados demográficos e relacionados ao transplante.....	40

3.7	Dados relacionados à infecção.....	40
3.8	Dados relacionados à colonização prévia.....	41
3.9	Desfechos.....	41
3.10	Determinação do efeito sinérgico.....	47
3.11	Determinação do efeito sinérgico pelo método do tabuleiro.....	47
3.12	Determinação do efeito sinérgico pelo método <i>time-kill</i>	50
3.13	Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	52
3.14	Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE).....	54
3.15	Sequenciamento do genoma total bacteriano por Illumina.....	59
3.16	Análise Estatística.....	60
3.17	Aspectos Éticos.....	61
4	RESULTADOS.....	62
4.1	População do estudo.....	63
4.2	Distribuição temporal dos casos.....	64
4.3	Características clínicas da população do estudo.....	65
4.4	Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e determinação da presença de genes de resistência.....	67
4.5	Perfil molecular dos isolados por PFGE.....	70
4.6	Análise do sequenciamento genoma total e determinação do MLST.....	71
4.7	Determinação dos efeitos das combinações antimicrobianas pelo método do tabuleiro (<i>checkerboard</i>).....	71
4.8	Determinação dos efeitos das combinações antimicrobianas pelo método de <i>time-kill</i>	74
4.9	Análise de sobrevivência.....	84
5	DISCUSSÃO.....	87
6	CONCLUSÕES.....	99
7	ANEXOS.....	101
8	REFERÊNCIAS.....	107

- AmpC** β -lactamase induzível
- APACHE** Acute Physiology and Chronic Evaluation
- AMK** Amicacina
- ATB** Antimicrobiano
- ATCC** American Type Culture Collection
- BGN** Bacilo gram-negativo
- BHI** Brain Heart Infusion
- BLAST** The Basic Local Alignment Search Tool
- BSI** Bloodstream infection
- CCIH** Comissão de Controle de Infecção Hospitalar
- CDC** Centers for Disease Control and Prevention
- CGP** Cocos Gram-positivos
- CIF** Concentração Inibitória Fracionária
- CIM** Concentração Inibitória Mínima
- CLSI** Clinical and Laboratory Standards Institute
- CMHCA** Caldo Muller Hinton Cátion Ajustado
- CMV** citomegalovírus
- COL** Colistina
- DECH** Doença do enxerto contra o hospedeiro
- DNA** Ácido Desoxirribonucleico
- ECFX** gene de virulência
- EDTA** Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
- ESBL** β -lactamase de espectro estendido
- EUCAST** European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
- Exo** gene de virulência
- FMUSP** Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
- GES** β -lactamase
- HC-FMUSP** Hospital das Clínicas Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
- HR** Hazard ratio
- HSCT** Hematopoietic stem cell transplant
- IC** Intervalo de confiança

ICS	Infecção da corrente sanguínea
IMI	β -lactamase
IMP	β -lactamase
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
LAS	gene de virulência
LIM	Laboratório de Investigação Médica
LPS	Lipopolissacarídeo
LOG	Logaritmo
MBL	Metalo- β -lactamase
MDR	Multidrogas Resistentes
MERO	Meropenem
MEX	Bomba de efluxo
MLST	Multilocus Sequence Typing
NDM	New Delhi Metalo β -lactamase
NHSN	National Healthcare Safety Network
NMC	β -lactamase
OMP	Proteína de Membrana Externa
OR	Odds Ratio
OXA	Oxacilinase
Pa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAO1	isolado conhecido de <i>P. aeruginosa</i>
PARC	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente à carbapenemicos
PBP	Proteína Ligadora de Penicilina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PFGE	Pulsed-field Gel Electrophoresis – Eletroforese de Campo Pulsado
PHZM	Gene de virulência
RNA	Ácido ribonucleico
RHL	gene de virulência
RR	Risco relativo
SOFA	Sequential Organ Dysfunction Assessment
SME	β -lactamase
SPM	β -lactamase

ST Sequence Type

TOX A gene de virulência

TCTH Transplante de célula-tronco hematopoiética

Tn transpóson

TSB Caldo triptona de soja

TTSS Type three secretion system – sistema de secreção tipo III

UFC Unidade Formadora de Colônia

VIM β -lactamase

XDR Extensivamente resistente

WGS Whole genome sequence Sequenciamento de genoma total

bp Pares de base
°C Graus Celsius
cm Centímetro
G Grama
Kb Kilobase
kDa Kilo Dalton
L Litro
M Molar
mg Miligrama
mL Mililitro
mM Milimolar
mm Milímetro
mmHg Milímetro de mercúrio
nm Nanômetro
µg Micrograma
µL Microlitro
µM Micromolar
ng Nanograma
nM Nanomolar
pH Potencial hidrogeniônico
rpm Rotação por minuto
s Segundos

Tabela 1	Descrição dos casos de infecção por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente a carbapenêmicos em pacientes submetidos a transplante de células-tronco hematopoéticas de acordo com revisão da literatura. FMUSP. São Paulo.	14
Tabela 2	Principais mecanismos de resistência bacteriana em <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Adaptado de Ruppé et.al ⁷² . FMUSP. 2018..... ..	
Tabela 3	Características demográficas e clínicas dos 28 pacientes receptores de TCTH com infecção de corrente sanguínea por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente a carbapenêmicos. FMUSP, São Paulo.	66
Tabela 4	Concentração inibitória mínima (CIM) em µg/mL pelo método de microdiluição em caldo dos antimicrobianos incluídos na pesquisa para os 30 isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e carbapenemases detectadas por PCR. FMUSP, São Paulo.....	69
Tabela 5	Genes relacionados com resistência a antimicrobianos e fatores de virulência determinados pelo sequenciamento do genoma total de 8 isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em infecções de corrente sanguínea. FMUSP, São Paulo – Brasil 2018.....	72
Tabela 6	Distribuição de mutações relacionadas com alterações na membrana externa bacterianas e presentes na análise do sequenciamento do genoma total bacteriano de 8 isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em infecção de corrente sanguínea. FMUSP, São Paulo.	73
Tabela 7	Resultado da pesquisa de efeito sinérgico ou indiferente das combinações antimicrobianas realizada pelo método de <i>checkerboard</i> e interpretada pelo método de two-well contra 30 isolados de <i>P. aeruginosa</i> . FMUSP, São Paulo.....	75
Tabela 8	Resultado da análise de sinergismo pelo método de <i>time-kill</i> para	

	diferentes combinações antimicrobianas testadas contra 30 isolados de <i>P. aeruginosa</i> resistente a carbapenêmicos. FMUSP, São Paulo.....	76
Tabela 9	Características microbiológicas: concentração inibitória mínima, presença de genes de resistência, genes de virulência e presença de sinergismo <i>in vitro</i> avaliadas em 30 isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente a carbapenêmicos. FMUSP, São Paulo.....	78
Tabela 10	Dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais dos pacientes submetidos a transplante de célula-tronco hematopoética com infecção de corrente sanguínea por <i>P. aeruginosa</i> resistente a carbapenêmicos analisados quanto ao desfecho óbito em 14 dias. FMUSP, São Paulo.....	79
Tabela 11	Dados microbiológicos dos 30 isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente à carbapenêmicos em infecções de corrente sanguínea de pacientes submetidos à transplante de células-tronco hematopoiéticas segundo o desfecho óbito. FMUSP. São Paulo.....	80
Tabela 12	Dados clínicos dos 25 pacientes transplantados com infecção de corrente sanguínea por <i>P. aeruginosa</i> analisados quanto a presença de sinergismo <i>in vitro</i> entre as diferentes combinações de antimicrobianos por meio do método de <i>time-kill</i> . FMUSP, São Paulo.....	82
Tabela 13	Dados clínicos de pacientes submetidos a transplante de célula-tronco hematopoiética com infecção de corrente sanguínea por <i>P. aeruginosa</i> resistente a carbapenêmicos analisados quanto ao tipo de transplante. FMUSP, São Paulo.....	83
Tabela 14	Dados clínicos de 23 pacientes transplantados com infecção de corrente sanguínea por <i>P. aeruginosa</i> que foram submetidos à pesquisa de colonização por este mesmo agente anteriormente à infecção. FMUSP, São Paulo.....	84

Figura 1	Principais complicações infecciosas após transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênico, de acordo com agentes etiológicos e tempo decorrido após a infusão das células. Modificado de Castro-Junior, 2001 ⁷ . FMUSP, São Paulo.....	3
Figura 2	Representação gráfica da constituição de uma bomba de efluxo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Modificado de El Zowalaty <i>et. al.</i> , 2015 ⁷⁸ . FMUSP, São Paulo.....	21
Figura 3	Definições esquematizadas para determinação de antagonismo, sinergismo e indiferença. Adaptado de Rybak <i>et al.</i> , 1996 ⁹² . FMUSP, São Paulo.....	25
Figura 4	Distribuição mundial dos clones de alto risco de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> reportados na literatura. Fonte: Adaptado de Oliver <i>et al.</i> , 2015 ⁷¹ . FMUSP, São Paulo.....	33
Figura 5	Avaliação dos critérios de inclusão dos pacientes com infecção de corrente sanguínea (ICS) por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente a carbapenêmicos em cada uma das etapas de análise microbiológica, clínica e de tratamento. FMUSP, São Paulo.....	64
Figura 6	Dendograma de acordo com PFGE para os 30 isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente a carbapenêmicos com informações de data de coleta, clone e presença ou ausência de genes de resistência a carbapenêmicos. FMUSP, São Paulo.....	70
Figura 7	Cinética de crescimento bacteriano em função do tempo para as diferentes combinações antimicrobianas avaliadas pelo método “time-kill”. A) colistina com meropenem (isolado 1), B) meropenem com amicacina (isolado 11), C) colistina com amicacina (isolado 9) e D) colistina com teicoplanina (isolado 29). FMUSP, São Paulo.....	77

Gráfico 1	Distribuição mensal da ocorrência de 28 casos de infecção de corrente sanguínea (ICS) por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> entre pacientes transplantados de célula-tronco hematopoiética entre janeiro de 2012 e dezembro de 2014. FMUSP, São Paulo.....	65
Gráfico 2	Curva de sobrevida de Kaplan Meier com avaliação do tipo de transplante de célula-tronco realizado e sobrevida intra-hospitalar de pacientes com infecção de corrente sanguínea por <i>P. aeruginosa</i> resistente a carbapenêmicos. FMUSP, São Paulo.....	85
Gráfico 3	Curva de sobrevida de Kaplan Meier com avaliação da presença do gene de virulência <i>lasB</i> e sobrevida intra-hospitalar de pacientes com infecção de corrente sanguínea por <i>P. aeruginosa</i> resistente a carbapenêmicos. FMUSP, São Paulo.....	86

Quadro 1	Fórmula para cálculo da concentração inibitória fraccional de ensaio de sinergismo antimicrobiano. Adaptado de Pillai et al., 2005 ⁹⁰ . FMUSP, São Paulo.....	27
Quadro 2	Cepas controle obtidas da <i>American Type Culture Collection</i> (ATCC) de acordo com os experimentos realizados. FMUSP, São Paulo.	43
Quadro 3	Pontos de corte dos antimicrobianos utilizados para determinação da CIM de acordo com os critérios estabelecidos pelo CLSI (2013). FMUSP, São Paulo.....	46
Quadro 4	Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos estabelecidos pelo CLSI (2013). FMUSP, São Paulo.....	46
Quadro 5	Sequência de oligonucleotídeos e suas respectivas temperaturas de anelamento utilizadas no estudo. FMUSP, São Paulo.....	53
Quadro 6	Sequência de oligonucleotídeos e suas respectivas temperaturas de anelamento utilizadas no estudo para genes codificadores de fatores de virulência. FMUSP, São Paulo.....	54
Quadro 7	Condições de corrida estabelecidas para PFGE de <i>P. aeruginosa</i> em CHEF DRII – BioRad. FMUSP, São Paulo.....	57

Ramos JF. *Avaliação da presença de sinergismo antimicrobiano in vitro contra isolados de Pseudomonas aeruginosa resistentes a carbapenêmicos obtidos em hemoculturas de pacientes submetidos à transplante de células precursoras hematopoiéticas* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2018.

A infecção de corrente sanguínea (ICS) causada por bactérias multirresistentes tem alta mortalidade em pacientes receptores de transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH). A *Pseudomonas aeruginosa* é um dos agentes mais frequentes e de difícil tratamento nessa população de pacientes. **Objetivos:** Avaliar características clínicas, microbiológicas e moleculares de 30 isolados de *P. aeruginosa* resistente à carbapenêmicos (PARC) em ICS de pacientes submetidos a TCTH e a presença de sinergismo antimicrobiano *in vitro*. **Métodos:** Os dados clínicos foram obtidos retrospectivamente de prontuários médicos e registrados em banco de dados. Análises bivariadas e multivariadas foram realizadas para avaliar determinantes de desfechos clínicos e uma curva de sobrevida foi construída. Determinou-se a concentração inibitória mínima (CIM) dos antimicrobianos por meio de microdiluição, foram realizados ensaios de sinergismo por método de *checkerboard* e *time-kill*, avaliação da clonalidade por eletroforese em campo pulsado e detecção de genes codificadores de mecanismos de resistência e virulência por reação em cadeia de polimerase. O sequenciamento do genoma completo (WGS) dos principais clones foi realizado por Nextera XT, utilizando a tecnologia Illumina MiSeq. **Resultados:** A maioria dos pacientes era do gênero feminino, com mediana de idade de 48 anos. Neutropenia foi presente em 93% dos pacientes e colonização prévia por PARC em 32%. A mortalidade em 14 dias foi 68%; a maioria dos pacientes que morreram foram transplantados alogênicos (79% vs. 17% entre receptores de transplante autólogo; $p=0,012$). Pacientes tratados com duas ou três drogas não apresentaram diferença estatisticamente significativa na mortalidade até 14 dias após a ICS. Foram avaliados 30 isolados bacterianos. Todos apresentaram alto nível de resistência ao meropenem (MERO): CIM90 > 512 µg/mL; dois terços eram resistentes à amicacina (AMK) (CIM 2-512 µg/mL) e todos mantinham sensibilidade à colistina (COL). Muitos isolados (17/30) alcançaram efeito sinérgico *in vitro* pelo método *time-kill* com a combinação MERO mais COL, mas não com AMK. Nenhum antagonismo foi observado. Houve menor mortalidade em pacientes cujo isolado apresentou sinergismo entre COL e MERO quando comparados a pacientes portadores de isolados sem sinergismo, sem significância estatística. O gene de carbapenamase mais identificado foi *bla_{SPM}* e 6 isolados apresentaram *bla_{SPM}* e *bla_{KPC}*. Os isolados apresentaram genes relacionados com virulência, tais como *toxA*, *exoS* e *lasB*; pacientes com ICS causada por *P. aeruginosa* que abrigava o gene *lasB* apresentaram maior risco de evoluir para o óbito. O WGS mostrou que os clones abrigavam SPM-1, Tn4371, mutações em porinas, em partes das bombas de efluxo, nas proteínas ligadores de penicilina (PBP) e pertenciam a ST277. **Conclusão:** As ICS por PARC cursaram com alta mortalidade em pacientes submetidos à TCTH. Houve uma grande proporção de resultados positivos para sinergismo entre os antimicrobianos *in vitro*, mas não foi possível demonstrar benefício estatisticamente significativo no uso da terapia combinada com três drogas. Os clones carregavam SPM-1, Tn4371 e pertenciam a ST277.

Descritores: *Pseudomonas aeruginosa*; sinergismo farmacológico; resistência a múltiplos medicamentos; carbapenêmicos; colistina; transplante

Abstract

Ramos JF. *Evaluation of antimicrobial in vitro synergy against carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa isolates from bloodstream infection in hematopoietic stem cell transplant recipients* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

Bloodstream infection (BSI) has high mortality in hematopoietic stem cell transplant (HSCT) recipients and *Pseudomonas aeruginosa* is an important and challenging organism. **Objectives:** To evaluate clinical, microbiological and molecular features of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* (CRPA) isolates from BSI identified among HSCT patients and address *in vitro* synergy of antibiotic combination. **Methods:** Patient medical records were retrospectively reviewed and registered in a database. We used bivariate and multivariate analyzes to investigate determinants of clinical outcomes, and demonstrated overall mortality using a survival curve. We determined minimal inhibitory concentrations (MIC) for antimicrobials and *in vitro* synergies using checkerboard and time-kill assays, pulsed-field electrophoresis (PFGE) for clonality assessment and polymerase chain reaction (PCR) to detect carbapenamases and virulence genes were performed for all isolates. Whole genome sequence (WGS) of main clones was performed by Nextera XT, using Illumina MiSeq technology. **Results:** Most patients were female, median age was 48 years old. Main baseline disease was acute leukemia and 68% received allogeneic HSCT. 93% of patients had neutropenia and 32% had prior CRPA gut colonization. 14-day mortality was 68%; mortality was higher among allogeneic HSCT recipients compared to autologous HSCT recipients (79% vs. 17% $p = 0,012$). Patients treated with two or three drugs did not present a statistically significant difference in 14-day mortality after BSI. In total, 30 bacterial isolates were analyzed; all presented a high resistance level to meropenem (MERO): MIC₉₀ > 512 µg/mL; two thirds were also resistant to amikacin (AMK) (MIC 2-512 µg/mL) and all were susceptible to colistin (COL). Many (17/30) isolates achieved *in vitro* synergistic effect in time-kill assay with the association of MERO and COL, but synergistic effect was not observed with AMK, by time-kill. No antagonistic effect was observed. There was a tendency towards better survival in patients whose CRPA isolate had *in vitro* synergy between COL and MERO without statistical significance. The most frequent carbapenamase gene identified was *bla*_{SPM}, and six co-harboured both *bla*_{KPC} and *bla*_{SPM}. Isolates presented genes related to virulence factors such as *tox*A, *exo*S and more patients with BSI caused by *P. aeruginosa* harbouring gene *las*B evolved to death. WGS analysis showed that clones harboured SPM-1, Tn4371 and belonged to ST277. They also presented mutations in genes related with porins and efflux pumps, as well in penicillin binding proteins (PBPs). **Conclusion:** CRPA BSI as associated with high mortality in HSCT recipients. A large proportion of isolates had *in vitro* synergy; however, we could not demonstrate statistically significant benefit in the use of combination therapy. Clones carried SPM-1, Tn4371 and belonged to ST277.

Descriptors: *Pseudomonas aeruginosa*; drug synergism; drug resistance, multiple; carbapenems; colistin; transplant.

1. Introdução

1.1 Transplante de células precursoras hematopoiéticas e infecções

A recomposição da medula óssea por meio do transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) é modalidade terapêutica empregada para um número cada vez maior de condições médicas, como leucemia aguda, linfomas, mieloma múltiplo, anemia aplástica, síndromes mielodisplásicas, imunodeficiências, hemoglobinopatias e doenças autoimunes¹.

Existem dois tipos de TCTH: autólogo e alogênico. O termo autólogo refere-se ao próprio paciente como sua fonte de células. Já no transplante alogênico as células progenitoras são coletadas de outro doador, seja um membro da família, um voluntário ou mesmo um banco de células de cordão umbilical².

Especialmente nesta última modalidade, o transplante substitui um órgão defeituoso de forma similar ao almejado nos transplantes de órgãos sólidos. Já nas doenças malignas tal terapia não só possibilita o uso mais seguro de drogas citotóxicas, com a recuperação após a mielossupressão ou mieloablação, como também provê células imunes que irão combater as células neoplásicas¹.

Dados do registro brasileiro em 2017 apontam 2794 TCTH realizados naquele ano, número 87% maior do que no início da série histórica, em 2007³.

Apesar do crescente uso como modalidade terapêutica, o TCTH é um procedimento complexo que associa-se também a morbidade significativa. No período peri-transplante inúmeras medidas de suporte são necessárias, como passagem de cateter venoso central para quimioterapia, infusão celular e

transfusões; também são utilizados imunossupressores para prevenção de rejeição e DECH, como é conhecida a doença do enxerto contra o hospedeiro⁴.

Durante o período inicial do TCTH, a ablação medular necessária neste procedimento resulta em neutropenia profunda e prolongada, que torna o paciente vulnerável a diversas complicações infecciosas⁵. A velocidade de reconstituição imune varia enormemente a depender do tipo do transplante, mais rápida no autólogo e mais lenta (acima de um ano) no alogênico, especialmente se a fonte das células for cordão umbilical⁶.

As infecções após a infusão das células são didaticamente divididas de acordo com seu momento de ocorrência e agentes etiológicos mais frequentes (Figura 1).

Figura 1- Principais complicações infecciosas após transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênico, de acordo com agentes etiológicos e tempo decorrido após a infusão das células. Modificado de Castro-Junior, 2001⁷. FMUSP, São Paulo.

Embora se trate de um grupo heterogêneo de pacientes, a depender da doença de base, do tipo de transplante, presença ou não de DECH; de um modo geral a infecção encontra-se entre as principais complicações,

responsável por 5% a 16% dos óbitos no primeiro ano após a infusão^{8,9}. Além disso a morbidade é também significativa: 85% dos pacientes apresentam ao menos um episódio infeccioso no mesmo período¹⁰.

Infecção de corrente sanguínea

Dentre as complicações infecciosas no período precoce após a infusão das células do doador, a infecção de corrente sanguínea (ICS) de etiologia bacteriana é muito prevalente, uma vez que o paciente está hospitalizado, faz uso de dispositivos invasivos, tem suas barreiras mecânicas de defesa alteradas (pele e mucosas) e reduzida imunidade celular e humoral¹¹.

Para fins epidemiológicos e de controle de infecção hospitalar, além da definição de infecção de corrente sanguínea primária como o reconhecimento de presença de patógeno não habitual da pele em uma ou mais hemoculturas, na ausência de infecção concomitante em outro sítio conhecido¹², o Centro de Controle de Doenças (CDC) norte-americano passou a considerar em separado a infecção de corrente sanguínea associada a injúria da barreira mucosa, observada comumente em pacientes submetidos a tratamentos oncológicos e cuja prevenção requer medidas diferentes daquelas realizadas no contexto de infecções relacionadas ao uso de cateteres vasculares¹³.

Epidemiologia das ICS em pacientes submetidos a TCTH

A literatura médica é repleta de relatos da ocorrência de complicações infecciosas em pacientes transplantados¹¹.

Embora o transplante autólogo seja caracterizado por baixa taxa de mortalidade relacionada ao procedimento *per se*, que varia de um a dez por cento, as ICS são as complicações infecciosas mais frequentes nesse grupo, como na experiência reportada por dois centros espanhóis cuja incidência foi de 20% apenas entre pacientes submetidos a esta modalidade¹⁴.

Já entre os pacientes que receberam transplante alogênico a importância da ICS é bem reconhecida e com pouca alteração na última década apesar do avanço tecnológico¹⁵.

Enquanto dados mais antigos do Brasil e da Itália relatavam incidência cumulativa de 20,6% nos primeiros 30 dias após a infusão de células e de 27% até os primeiros 180 dias¹⁶, recentemente centro norte-americano reportou incidência cumulativa de 42% até os 100 dias após o transplante¹⁷.

Neste último estudo, a avaliação de fatores de risco associados a ocorrência de ICS demonstrou que transplantados alogênicos apresentaram risco relativo (RR) de três (Intervalo de confiança (IC) 95% 2,30-4,11; $p < 0,01$) para infecção de qualquer etiologia, até o trigésimo dia do transplante quando comparados com transplantados autólogos; o RR aumentou para 6,7 no segundo mês (IC 95% 3,3-13,9; $p < 0,01$) e para 59,9 no terceiro mês após a infusão da medula (IC 95% 8,2-43,5; $p < 0,01$). Na análise restrita aos transplantados alogênicos, o condicionamento mieloablativo resultou em RR de 1,7 vezes comparado ao condicionamento de intensidade reduzida (IC 95%

1,2-2,3; $p < 0,01$); o desenvolvimento de DECH aguda foi também implicado em risco maior de ICS¹⁷.

Etiologia das infecções de corrente sanguínea

Classicamente predominavam entre os agentes etiológicos das ICS em pacientes neutropênicos bactérias Gram-positivas¹⁸. Hospitais de países como a Espanha até recentemente descreveram maior proporção de ICS causadas por cocos Gram-positivos (CGP) em cerca de 57% dos casos¹⁹. No entanto, tal perfil se modificou nos últimos anos, fenômeno este mundial. Diversos centros vêm reportando uma maior proporção de bacilos Gram-negativos (BGN) frente aos CGP que predominaram na década de 90, inversão atribuída em parte a translocação bacteriana intestinal propiciada pela mucosite, ao uso ampliado de antibioticoterapia profilática, bem como emprego de medidas preventivas na inserção e cuidado do cateter venoso de longa permanência²⁰.

Recentemente em inquérito respondido por centros europeus e de Israel que participam da Conferência Europeia sobre Infecções em Leucemia, bactérias do gênero *Enterobacteriaceae* foram isoladas em aproximadamente 30% (8 a 56%) das ICS, seguida por estafilococos coagulase-negativos, presente em 24% dos episódios²¹.

Na unidade de TCTH do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) em análise temporal de nove anos predominaram os BGN (53,8%) como agente etiológico de ICS durante a neutropenia. A bactéria mais isolada foi a *P. aeruginosa* (22%),

seguida por estafilococos coagulase-negativos²². Posteriormente, no mesmo serviço, Ferreira e colaboradores reportaram incidência cumulativa de ICS antes da enxertia medular de 25,4%. Da mesma forma que no período anterior, os BGN continuaram a predominar entre os microrganismos identificados (53.3%), e dentre eles a *P. aeruginosa* continuou como o agente mais importante, causando 21% das infecções²³.

Essa tendência exige maior atenção por parte da equipe assistencial e do controle de infecção, uma vez que as infecções causadas por BGN têm maior mortalidade e disseminação do que as infecções por CGP.

Mortalidade associada às ICS

No trabalho realizado no HCFMUSP²² foram fatores de risco independentes para o óbito na análise multivariada: idade avançada (*odds ratio* (OR) 1,0; IC 95% 1,0–1,4), transplante alogênico (OR 3,0; IC 95% 1,6–5,5) e infecção documentada micro-biologicamente (OR 2,9; IC 95% 1,8–4,6).

Em doentes onco-hematológicos essa diferença de mortalidade a depender do agente etiológico também foi encontrada, com grupo italiano descrevendo uma mortalidade em 30 dias de 24% para infecções por microrganismos Gram-positivos, 31% em Gram-negativos e 40% nas ICS causadas por fungos. Dentre os BGN, as ICS por *P. aeruginosa* resultaram em mortalidade de 67%, com todos os óbitos nos primeiros sete dias após a infecção²⁴.

A *P. aeruginosa* destaca-se como agente etiológico preocupante em

outros serviços no mundo, como em um importante centro norte-americano de TCTH que, em análise retrospectiva de seus 95 episódios de infecção por *P. aeruginosa*, encontrou 35,8% de mortalidade atribuída à infecção²⁵.

Resistência antimicrobiana

Não só a maior participação de BGN como agentes causadores de infecções, mas também o aumento na incidência de micro-organismos resistentes à terapia usual é motivo de preocupação em diversos países do mundo, dado o arsenal terapêutico limitado disponível nessa situação.

Enquanto entre os anos 1999 e 2008, a sensibilidade de BGN ao meropenem (MERO), uma importante droga utilizada no tratamento empírico e direcionado de ICS em receptores de TCTH, avaliada em cem laboratórios no mundo para o sistema de vigilância MYSTIC (Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection) permaneceu estável com 85,4% dos 439 isolados testados sensíveis²⁶, tal cenário apresentou mudanças recentes especialmente em publicações com populações de áreas hospitalares críticas, como terapia intensiva, imunodeprimidos e pneumopatas.

Na terapia intensiva a resistência de *P. aeruginosa* aos carbapenêmicos foi estudada em 13 hospitais norte-americanos, com achado de alta prevalência e diferença significativa ($p = 0,03$) entre as unidades hospitalares de origem da infecção: 35% de resistência em unidades de terapia intensiva versus 27% em unidades gerais, dados muito alarmantes quando comparados ao período anterior²⁷.

Da mesma forma, o centro de controle e prevenção de doenças europeu revela taxas de multidroga-resistência em isolados de *P. aeruginosa* de 17%, com variações nacionais entre 3 e 51% entre os 29 países monitorados²⁸.

Diferente do observado em unidades de terapia intensiva, entre os pacientes transplantados a *P. aeruginosa* multidroga-resistente é mais frequentemente isolada do que a *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase, a despeito do potencial de rápida disseminação da última ^{21,29}.

No HCFMUSP um surto de *P. aeruginosa* resistente a carbapenêmicos foi identificado na unidade de TCTH em 2012. O uso prévio de carbapenêmicos foi o único fator de risco independente identificado na análise multivariada de estudo caso-controle (OR 22,0; IC 95% 1,1–44,4; $p=0,043$). A maioria dos isolados apresentava genes codificadores de carbapenemases³⁰.

Resistência antimicrobiana e mortalidade

O desconhecimento do perfil de sensibilidade local resulta muitas vezes em escolha inapropriada para terapia antimicrobiana inicial, com maior mortalidade no grupo com infecção pelo isolado resistente, como o observado neste estudo brasileiro, no qual a mortalidade em 30 dias em pacientes com ICS por *P. aeruginosa* resistente foi 54,2%, contra 44,8% em isolados sensíveis³¹.

A terapia empírica inicial correta já se mostrou crucial em ICS por *P. aeruginosa* em diferentes populações e unidades hospitalares, especialmente

em terapia intensiva ³².

Recentemente em um centro espanhol, 709 ICS por *P. aeruginosa* foram revisadas. Nesta população, o uso de terapia inicial inapropriada foi maior nos isolados considerados multidroga-resistentes (MDR, resistência a três ou mais classes diferentes de antimicrobianos): 46% versus 31% ($p=0,001$)³³.

Seguindo essa tendência mundial de mudança no perfil de sensibilidade, embora heterogênea, a população com câncer também passou a apresentar incidência maior de infecções por bactérias resistentes³⁴.

Em um estudo de coorte retrospectivo realizado em Israel ³⁵, foram avaliados pacientes onco-hematológicos e transplantados que desenvolveram ICS por BGN entre os anos 2008 e 2014. Neste grupo a mortalidade entre pacientes com isolados resistentes a carbapenêmicos foi de 45,6% versus 15,0% nos pacientes cuja infecção foi causada por isolados sensíveis ($p=0,001$). Houve ainda forte associação entre infecção por isolado resistente a carbapenêmicos e mortalidade em 14 dias (OR 5,1; IC 95% 2,3–11,3) em sua análise multivariada.

Mais uma vez em pacientes onco-hematológicos, em Singapura, um estudo retrospectivo avaliou infecções por *P. aeruginosa* denominada “extensivamente resistente” ou XDR, definida pelos autores como resistente a todas as drogas, exceto 1 ou 2 classes. Entre os 26 casos, 57% eram ICS. O uso prévio de carbapenêmicos aumentou em 10,6 vezes a chance de isolamento de micro-organismo XDR (IC 95% 1,88-59,9 $p< 0,01$). A mortalidade atribuída à infecção foi 53% ³⁶.

Na população de imunodeprimidos a mortalidade relacionada a ICS por

P. aeruginosa parece ser ainda maior. Em um estudo conduzido em um hospital universitário japonês ³⁷, a avaliação de 126 pacientes adultos com ICS por *P. aeruginosa* mostrou menor mortalidade em sete dias entre os imunocompetentes (8% vs. 30%, $p < 0,01$), achado que se confirmou na análise após trinta dias (23% vs. 39%, $p = 0,053$). Nesse mesmo estudo, ao se analisar o subgrupo de pacientes imunodeprimidos, a antibioticoterapia inicial adequada foi protetora, sendo associada a menor mortalidade em 30 dias (20,5% vs. 66,7%, $p < 0,01$). Dessa forma, ressalta-se a importância da introdução precoce e apropriada de terapia antimicrobiana especialmente para esse grupo de pacientes.

Resistência antimicrobiana no cenário de TCTH

Diferentes grupos avaliaram a dimensão da resistência aos antimicrobianos entre pacientes submetidos a TCTH, porém com diferentes definições e nomenclaturas ao longo dos anos.

Estudo multicêntrico brasileiro relatou em pacientes submetidos a TCTH que o uso prévio de cefalosporinas de 3^a geração (OR 10,6; IC 95% 3,7–30,2), bem como a internação em um hospital específico (OR 9,4; IC 95% 2,6–34,4) associaram-se a maior risco para infecção por Gram-negativo MDR³⁸. O mesmo grupo posteriormente também reportou que um segundo episódio de ICS na vigência de terapia empírica para neutropenia febril seria fator de risco para isolamento de agente MDR (OR 32,9; IC 95% 5,0-190,0; $p < 0,001$). Ainda nessa população as ICS por agentes resistentes foram associadas com maior mortalidade (40% versus 9% $p = 0,03$) ³⁹.

Ao compilar-se relatos, séries e coortes de pacientes transplantados com ICS por *P. aeruginosa* e considerando como marcador de resistência a perda de sensibilidade aos carbapenêmicos, existem poucos casos publicados. A literatura traz uma média de 44% de resistência em população adulta e 25% de resistência em pediatria²¹, mas os dados clínicos, microbiológicos e de evolução são pobres (**Tabela 1**).

Outra dúvida entre os diferentes serviços é o papel da pesquisa de colonização para bactérias multidroga-resistentes. Os dados são bem limitados, com experiências pequenas como a reportada por Nesher e colaboradores⁴⁰, cuja coorte de TCTH alogênico contava com 12 pacientes colonizados por *P. aeruginosa* resistente a carbapenêmicos e destes sete desenvolveram infecção clínica. Já dentre os 736 aparentemente não-colonizados, seis apresentaram infecção invasiva, não permitindo qualquer conclusão em relação ao papel da colonização. Nestes 13 casos não houve nenhum óbito atribuído à infecção.

Recentemente um grupo polonês estudou retrospectivamente os dados de colonização entre 107 transplantados alogênicos, 31% dos quais previamente colonizados por alguma bactéria MDR. Os autores demonstraram impacto negativo da colonização na sobrevida global após o transplante (*Hazard Ratio*, HR 3,53; IC 95% 1,7-7,2; $p < 0,001$). No entanto apenas quatro eram colonizados por *P. aeruginosa* e houve somente uma infecção por este agente⁴¹.

No HCFMUSP a colonização prévia por bactérias MDR também é muito frequente. Entre 232 transplantados avaliados entre 2014 e 2015, 40%

eram colonizados e houve associação entre colonização prévia por BGN MDR e ICS (HR 12,7; IC 95% 2,5-63,9; $p=0,002$)²³.

Tabela 1- Descrição dos casos de infecção por *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenêmicos em pacientes submetidos a transplante de células-tronco hematopoéticas de acordo com revisão da literatura. FMUSP. São Paulo.

Autor	Local	Ano	Material	Total bactérias (n)	CGP (%)	BGN (%)	<i>P. aeruginosa</i> (n)	MDR- <i>Pa</i> (n)	Obitos geral	Obitos <i>Pa</i>	Obitos MDR- <i>Pa</i>	Genes
Wisplinghoff (42)	EUA	2003	sangue	2711	59.4%	26%	119	7	32%	36%	-	-
Cherif (43)	Suécia	2003	sangue	1402	54.7%	45.2%	77	3	15.60%	25%	-	-
Velasco (44)	Brasil	2004	sangue	1036	56.2%	31.6%	73	10	-	-	-	-
Aubron (45)	França	2005	Sangue, urina,	-	-	-	-	26**	-	-	-	VIM-2
Mencacci (46)	Itália	2006	sangue	-	-	-	1	1	100%	100%	100%	
Micol (47)	França	2006		18	-	-	18	9				
Gil (48)	Polônia	2007	sangue	159	60.3%	28.9%	6	1	13.20%	16.70%	-	-
Oliveira (38)	Brasil	2007	sangue	118	50%	50%	13	4	-	4%	20%	-
Kalai Blagui (49)	Tunisia	2007	sangue , abscesso, fezes	-	-	-	24	7	-	-	-	OXA-18
Corvec (50)	França	2007	sangue , urina, escarro	6527	-	100%		9	-	-	-	VIM-2
Mikulska (20)	Itália	2009	sangue	182	56.5%	37.3%	18	8	20.20%	66.7%	100%	-
Johnson (51)	EUA	2009	sangue	-	-	-	14	4	-	-	-	-
Caselli (52)	Itália	2010	sangue	-	-	-	127	28	-	19.60%	35.8%*	-
Paez (53)	Brasil	2011	sangue	-	-	-	13	13	-	-	-	SPM-1, VIM-2
Nagao (54)	Japão	2011	sangue, escarro, urina, pele	-	-	-	17	17	-	-	-	IMP-1
Kanda (55)	Japão	2011	sangue	-	-	-	1	1	-	-	0	-

(continuação)

Tabela 1- Descrição dos casos de infecção por *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenêmicos em pacientes submetidos a transplante de células-tronco hematopoéticas de acordo com revisão da literatura. FMUSP. São Paulo. (continua)

Autor	Local	Ano	Material	Total bactérias (n)	CGP (%)	BGN (%)	<i>P. aeruginosa</i> (n)	MDR- <i>Pa</i> (n)	Obitos geral	Obitos <i>Pa</i>	Obitos MDR- <i>Pa</i>	Genes
Joosten (56)	Bélgica	2012	sangue	-	-	-	4	4	-	-	-	-
Ghosh (57)	India	2012	sangue , abscesso, urina	79	44.3%	55.7%	12	6	8%	-	-	-
Mudau (58)	Africa do Sul	2013	sangue	-	-	-	10	10	-	-	80%	-
Metan (59)	Turquia	2013	sangue	154	-	-	15	5	-	20%	-	-
Nesher (40)	EUA	2014	Sangue (20), urina e escarro	56	-	-	56	18	-	0	0	-
Mikulska (21)	Europa	2014	sangue	-	55%	45%	5%	15	-	-	-	-
Wang (60)	China	2015	sangue	108	26%	70%	1	1	13%	100%	100%	-
Andria (35)	Israel	2015	sangue	423*	-	100%	82	15*	22,4%	-	-	-
Migiyama (37)	Japão	2015	sangue	66*	-	100%	66	22*	39%	-	-	-
Trecarichi (15)	Italia	2015	sangue	668*	46,6%	52,8%	66	46*	13,2%	32,6%	42,4%	-
Stoma (61)	Bielorrússia	2016	sangue	135	35%	65%	12	10	31%	-	40%	-
Demiraslan (62)	Turquia	2017	Sangue e colonização	-	-	-	-	2	-	-	50%	-
Girmenia (63)	Italia	2017	Sangue	149	0	100%	34	9	17,9%	-	75%	-
Averbuch (64)	25 países (Europa, Asia e Australia)	2017	sangue	1359	52%	48%	95	36	6,5%	-	-	-
Ferreira (23)	Brasil	2018	Sangue, e colonização	62	55,2%	42,3%	13	12	20,9%	-	66%	-

Legenda: CGP: cocos Gram-positivos; BGN: bacilos Gram-negativos; Pa: *Pseudomonas aeruginosa*; MDR-Pa: *P. aeruginosa* resistente a 3 ou mais classes de antimicrobianos;

Mecanismos de resistência antimicrobiana em *P. aeruginosa*

O conhecimento detalhado dos mecanismos que tais bactérias utilizam para se tornar resistentes aos antimicrobianos se faz necessário tanto para melhor adequação do tratamento das infecções, quanto para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas⁶⁵.

A emergência e a disseminação de inúmeros micro-organismos resistentes resultam da combinação de múltiplos fatores, tais como: mutações dos genes de resistência; troca de informações genéticas nas quais os genes de resistência são transferidos para novos micro-organismos; pressão seletiva exercida pelas condições do meio, as quais podem ocorrer em nível global⁶⁶.

Nas bactérias Gram-negativas a membrana externa pode fornecer uma barreira intrínseca adicional que impede que as drogas alcancem seus alvos^{67,68}.

As bactérias podem ser intrinsecamente resistentes a um antimicrobiano ou adquirir resistência por meio da aquisição de genes plasmidiais ou por mutações. A resistência adquirida reflete uma mudança na composição genética de uma bactéria que pode resultar em atividade antimicrobiana diminuída, mas não a perda completa da eficácia da droga⁶⁹.

A *P. aeruginosa* é reconhecida por possuir uma combinação de fatores que atuam em conjunto para conferir amplo espectro de resistência (Tabela 2): apresenta intrinsecamente baixa permeabilidade da parede celular e ainda mecanismos adquiridos por meio de mutação de genes cromossômicos e

aquisição de genes de outros micro-organismos via elementos genéticos móveis, como plasmídios, transpósons ou bacteriófagos⁷⁰.

Atualmente, um dos principais problemas para o tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa* multidroga resistente (MDR) no Brasil é a produção de enzimas que hidrolisam os carbapenêmicos, considerados os antimicrobianos mais potentes e mais utilizados nos tratamentos das infecções graves⁷¹.

Tabela 2- Principais mecanismos de resistência bacteriana em *Pseudomonas aeruginosa*. Adaptado de Ruppé et.al ⁷². FMUSP. 2018.

MECANISMO	EVENTO GENETICO	ANTIMICROBIANOS ALVO
Expressão alto nível AmpC	Mutação cromossômica	Penicilinas, Cefalosporinas, Aztreonam
Outras b-lactamases	Aquisição de elemento genético móvel	-
Penicilinas	-	Penicilina
Beta-lactamase espectro estendido	-	Penicilinas, Cefalosporinas, Aztreonam
Metalo-betalactamase	-	Penicilinas, Cefalosporinas, Carbapenêmicos
Impermeabilidade (OprD)	Mutação cromossômica	Imipenem
Bombas de Efluxo	Mutação cromossômica	-
MexAB-OprM	-	Cefalosporinas, meropenem e quinolonas
MexXY-OprM	-	Cefepime, aminoglicosídeos e quinolonas
MexEF-OprN	-	Meropenem e quinolonas
MexCD-OprJ	-	Cefepime, aztreonam e quinolonas
Enzimas modificadores	Aquisição de elemento genético móvel	Aminoglicosídeos
Metilases rRNA16S	Aquisição de elemento genético móvel	Aminoglicosídeos
Modificação topoisomerasas	Mutação cromossômica	Fluorquinolonas
Modificação Lipídica (LPS)	Mutação cromossômica	Polimixina

1.2 Produção de enzimas

Uma ampla variedade de antimicrobianos β -lactâmicos é usada no tratamento de doenças infecciosas. Esses antimicrobianos bloqueiam a biossíntese da parede celular da bactéria pela inibição de uma transpeptidase, enzima que catalisa a ligação cruzada dos polímeros de peptideoglicano na parede celular e são membros da família das proteínas ligadoras de penicilina (PBP). Entretanto, as bactérias desenvolveram inúmeras estratégias para resistir a essa classe e uma das mais importantes é a produção de betalactamases, enzimas que catalisam a hidrólise do anel β -lactâmicos, inativando o antimicrobiano⁷².

Tais enzimas são classificadas de acordo com sua homologia na sequência de aminoácidos ou de acordo com sua preferência por determinado substrato⁷³. As carbapenemases vem ganhando cada vez mais relevância por sua capacidade de hidrolisar principalmente os carbapenêmicos, última opção clínica em muitos tratamentos.

As carbapenemases do grupo A incluem membros designados SME, IMI, NMC, GES e a família das KPCs. Possuem em seu sítio alvo um grupamento serino.

Já a classe B é formada pelas metalo- β -lactamases (M β L), grupo 3 da classificação de Bush⁷³, e possuem maior eficiência em hidrolisar os carbapenêmicos quando comparadas às oxacilinases. São capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas, mas não possuem ação contra o aztreonam e são resistentes a ação da maioria dos inibidores de enzimas. Necessitam de zinco em seu sítio alvo para exercer sua função hidrolítica, por

isso perdem sua atividade na presença do ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), um quelante de zinco e outros cátions bivalentes.

No Brasil, o primeiro relato de cepas produtoras de M β L ocorreu em 2002, em isolados de *P. aeruginosa* obtidos do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho no Rio de Janeiro ⁷⁴, desde então já foram descritos no Brasil diferentes classes de M β L como, por exemplo, IMP-1, IMP-6, IMP-16, VIM-2 e SPM-1 ⁷⁵.

A São Paulo Metallo-b-lactamase (SPM) foi identificada pela primeira vez no mundo em uma amostra de *P. aeruginosa* de um paciente internado no Hospital São Paulo/Universidade Federal de São Paulo e parece estar relacionado essencialmente a essa espécie bacteriana ⁷⁶.

A classe D consiste no grupo OXA, frequentemente descrito em *Acinetobacter baumannii*. Os genes que codificam essas enzimas são carregados por plasmídeos, que além de determinarem resistência aos antimicrobianos, podem transmitir genes de virulência.

Devido às características de transmissão de um plasmídeo, os genes são facilmente disseminados entre espécies e gêneros diferentes, resultando em surtos por patógenos cada vez mais resistentes e virulentos, bem como expressão de múltiplas β -lactamases ⁷⁷.

1.3 Alteração da permeabilidade da membrana externa

A membrana externa dos Gram-negativos é composta por fosfolipídios, lipopolissacarídeos e moléculas de proteínas de estrutura trimérica, conhecidas

como porinas ou proteínas de membrana externa (*outer membrane protein*, OMP). Essas proteínas cruzam a estrutura interna da membrana formando canais de transporte que permitem a difusão de substâncias hidrofílicas e pequenos nutrientes ⁷⁸.

1.4 Efluxo do antimicrobiano

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. O sistema de expulsão necessita de gasto de energia pela bactéria, porém, não ocasiona degradação da droga ⁷⁹.

As bombas de efluxo são comuns em isolados resistentes de *P. aeruginosa* e impedem o acúmulo do antimicrobiano antes do mesmo atingir concentração adequada no sítio de infecção. As mesmas trabalham em conjunto com a alteração da permeabilidade da membrana externa e geram resistência a beta-lactâmicos, fluoroquinolonas, tetraciclina, cloranfenicol, macrolídeos e aminoglicosídeos.

São compostas por três proteínas estruturalmente ligadas (Figura 2) que incluem bomba dependente de energia na membrana citoplasmática (MexB), uma porina na membrana externa (OprM) e uma proteína ligando ambas (MexA).

Os quatro principais sistemas de efluxo em *P. aeruginosa* são MexAB-OprM, MexXY-OprM, MexCD-OprJ e MexEF-OprN:

Figura 2- Representação gráfica da constituição de uma bomba de efluxo de *Pseudomonas aeruginosa*. Modificado de El Zowalaty *et. al.*, 2015⁷⁸. FMUSP, São Paulo.

MexAB-OprM e MexXY-OprM contribuem para a resistência intrínseca a beta-lactâmicos e aminoglicosídeos, respectivamente⁸⁰.

1.5 Alteração do sítio de ligação da droga

Alteração de sítio-alvo é a mais comum forma de resistência a quinolonas em *P. aeruginosa*, devido a mutações no gene *gyrA*. Também já foi demonstrado que a presença do gene *rmtA* resulta em alta resistência à aminoglicosídeos⁷⁸.

Por sua vez, o sítio de ação dos β -lactâmicos é uma enzima denominada PBP presente na membrana citoplasmática. Essas PBPs podem sofrer alterações por mutação ou produção de proteínas suplementares, com baixa afinidade ao antimicrobiano ⁶⁷. Cada antimicrobiano β -lactâmico possui maior afinidade com uma determinada PBP⁸¹ e existem relatos de modificação de PBP em *P. aeruginosa* associada a resistência a carbapenêmicos ⁸².

1.6 Terapia combinada e sinergismo *in vitro*

Diante dos inúmeros e complexos mecanismos de resistência aos antimicrobianos apresentados por esse bacilo não-fermentador e da alta morbimortalidade associada a infecções por ele causadas, o uso de terapia combinada entre duas ou mais drogas ativas para melhores taxas de cura e sobrevida é sempre atraente.

O uso combinado de antimicrobianos é uma prática comum no tratamento de infecções graves, tanto de origem comunitária como de origem hospitalar, e experiências clínicas são cada vez mais reportadas, especialmente neste contexto de infecções por gram-negativos MDR de difícil tratamento, como por *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*⁸³.

Para cobertura anti-pseudomonas o uso de terapia combinada inicial reduz significativamente a chance de cobertura inapropriada, embora com desfechos semelhantes quando comparado à monoterapia com betalactâmicos

Inicialmente fluorquinolonas como levofloxacino e ciprofloxacino foram avaliadas como parte de regime combinado de tratamento com grande vantagem pelo perfil de menor nefrotoxicidade. No entanto, apresentam maior propensão para seleção de cepas mutantes superprodutoras de bombas de efluxo capazes de desenvolver resistência *in vivo* e *in vitro* ^{85,86}. Na população de TCTH esse dado é ainda mais relevante, uma vez que a levofloxacino é a droga de escolha para profilaxia bacteriana primária ⁸⁷.

A associação entre carbapenêmicos e outras classes, principalmente polimixinas e aminoglicosídeos, ganhou destaque nos últimos anos e publicações recentes passaram a sugerir benefício desta combinação, seja pela cobertura empírica correta precoce, seja por um possível efeito aditivo ou sinérgico ¹⁸.

Mais recentemente um grupo brasileiro foi o primeiro a demonstrar uma superioridade clínica do uso de terapia combinada entre polimixina e outros antimicrobianos com resistência *in vitro* no tratamento de infecções por *A. baumannii* e *P. aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos. Porém as infecções por *P. aeruginosa* foram minoria (18 casos) e a imensa maioria das infecções descritas ocorreu em sítios outros que não corrente sanguínea ⁸⁸.

Uma importante limitação é a falta de ensaios clínicos com o uso desses medicamentos especificamente em população submetida a TCTH, uma vez que esse grupo recebe diversos medicamentos (por exemplo, ciclosporina, micofenolato, azólicos e antivirais) e são mais susceptíveis a interações medicamentosas e eventos adversos, como nefrotoxicidade ⁸⁹.

1.7 Sinergismo de antimicrobianos

O uso combinado de dois ou mais antimicrobianos pode aumentar a probabilidade de se contar precocemente com uma droga realmente ativa contra o patógeno, porém outro argumento favorável a essa estratégia de tratamento são especulações quanto a existência de sinergismo *in vitro* entre as diferentes drogas. Já possíveis efeitos adversos, toxicidade e custo são razões contrárias ao uso de terapias combinadas, embora tal prática seja comum no tratamento de infecções graves e na suspeita de etiologia polimicrobiana.

Define-se sinergismo *in vitro* como a demonstração de superioridade na atividade antimicrobiana de dos agentes testados conjuntamente, quando comparada ao efeito de cada um deles individualmente ⁹⁰.

A técnica laboratorial mais utilizada para avaliação do sinergismo é a técnica do tabuleiro, conhecida como *checkerboard*, baseada em concentrações fixas de antimicrobianos. Outro método descrito para avaliação do sinergismo antimicrobiano é o tempo de morte (*time-kill*) que avalia a atividade bactericida da droga obtendo dados de potência em função do tempo

⁹¹.

O sinergismo pode ocorrer mesmo quando há resistência aos antimicrobianos individualmente, pois o conceito implica em aumento de potência antimicrobiana da combinação, ainda que não exista sensibilidade a cada agente individualmente.

Define-se antagonismo quando há prejuízo à atividade dos antimicrobianos e indiferença quando a adição de antimicrobianos não altera o

desempenho das drogas isoladamente ⁹². A Figura 3 representa as definições acima detalhadas.

Os estudos *in vitro*, entretanto, são questionáveis. Não há até o momento critérios do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) ou do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) que definam a metodologia ideal para avaliação do sinergismo. Vários fatores podem interferir na correlação do resultado *in vitro* com a resposta terapêutica. A farmacocinética das drogas utilizadas na terapia combinada, por exemplo, pode interferir negativamente nessa correlação.

Legenda: ATB Antibiótico

Figura 3- Definições esquematizadas para determinação de antagonismo, sinergismo e indiferença. Adaptado de Rybak et al., 1996 ⁹². FMUSP, São Paulo.

A concentração de cada uma das drogas no ser humano é variável, mas nos estudos *in vitro* estas proporções são mantidas fixas. Além disto, as características da infecção e do paciente também podem interferir no resultado

da combinação ⁹². O efeito sinérgico também pode estar relacionado com os mecanismos de resistência presente no isolado em estudo, sendo necessária a avaliação de cada isolado ⁹¹.

Desta forma, a decisão final do uso sistemático da terapia combinada depende ainda de ensaios clínicos e da avaliação do mecanismo de resistência e clonalidade dos isolados.

1.8 Método do tabuleiro ou *checkerboard*

Nesta técnica o formato de “tabuleiro” decorre do aspecto formado na placa por diferentes diluições dos dois antimicrobianos em teste, em concentrações iguais, acima, e abaixo das suas concentrações inibitórias mínimas (CIMs) contra os micro-organismos que são testados e avaliados pela concentração inibitória fracional (CIF), uma reformulação matemática do isoblograma. Neste método, o CIF para cada fármaco é obtido pela divisão da concentração da droga necessária para inibir o crescimento da bactéria em sua linha de teste pela CIM da bactéria em teste para a droga sozinha.

Era o método mais usado na literatura para reportar os resultados de estudos com combinações antimicrobianas nas últimas décadas ^{90,93}.

$$\frac{(A)}{(CIM_A)} + \frac{(B)}{(CIM_B)} = CIF_A + CIF_B = \mathbf{CIF}$$

(A) a menor concentração da droga A na sua linha. (CIM_A) CIM do organismo a droga A sozinho. CIF_A concentração inibitória fracionada de fármaco A. (B) a menor concentração da droga B na sua coluna. (CIM_B) e CIF_B são definidos da mesma maneira para a droga B.

Quadro 1- Fórmula para cálculo da concentração inibitória fraccional de ensaio de sinergismo antimicrobiano. Adaptado de Pillai et al., 2005⁹⁰. FMUSP, São Paulo.

1.9 Método de curva de morte microbiana ou *time-kill*

Também utilizado para avaliar as combinações antimicrobianas, o *time-kill* fornece dados para avaliação da atividade bactericida dos antimicrobianos indicando o tempo da interação da droga baseado na contagem de colônias por meio de semeaduras seriadas⁹⁰.

Um estudo conduzido por Bonapace e colaboradores apresenta o uso de diferentes métodos para interpretar os resultados por tabuleiro: o método de CIF comparado com o *time-kill* apresentou 40% de concordância, enquanto o método de *two-well* apresentou 70%⁹⁴. A padronização de interpretação é fundamental para diminuir resultados divergentes.

1.10 Sinergismo Antimicrobiano e *P. aeruginosa*

Embora em número pequeno quando comparado às casuísticas que estudam sinergismo *in vitro* para *Acinetobacter baumannii*, por exemplo, cada vez mais diferentes grupos apresentam resultados sobre efeitos de drogas testadas *in vitro* contra *P. aeruginosa* em diferentes contextos clínicos ^{95,96}.

Uma das populações estudadas é a de pacientes com fibrose cística. Recentemente em meio a ampla avaliação de estafilococos resistentes a meticilina e gram-negativos não fermentadores, duas cepas de *P. aeruginosa* multissensíveis foram avaliadas quanto ao sinergismo entre tobramicina/amicacina e ácido fusídico que resultou negativa ⁹⁵. Já um número maior de isolados (n=18) foram testados para a combinação entre doripenem e fosfomicina, também sem qualquer efeito sinérgico ⁹⁶.

Outro estudo recente realizado na França avaliou por meio do método do tabuleiro a combinação entre colistina e trimetoprim, colistina e cotrimoxazol e colistina e vancomicina para *A. baumannii*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* (três isolados clínicos e um cepa padrão da *American Type Culture Collection*, ATCC, de cada espécie). Nenhum isolado de *P. aeruginosa* sofreu ação sinérgica com a combinação testada ⁹⁷.

Resultados mais animadores, no entanto, foram obtidos na avaliação de 100 isolados de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos com teste de sinergismo de doripenem com amicacina, com colistina e com levofloxacino, com efeito sinérgico ou aditivo em 67%, 31% e 23% dos casos, respectivamente ⁹⁸.

Mesmo com a presença de resistência completa aos antimicrobianos, em combinação, o mesmo pode apresentar efeito sinérgico, como o reportado por nosso grupo entre isolados de *A. baumannii* com o uso da vancomicina ⁹⁹.

Até o momento não existem estudos de sinergismo antimicrobiano em isolados de pacientes submetidos a TCTH.

1.11 Fatores de virulência da *P. aeruginosa*

A *P. aeruginosa* é considerada micro-organismo de difícil tratamento tanto por sua resistência antimicrobiana intrínseca e adquirida, como discutido acima, quanto por produzir inúmeros fatores de virulência, sejam intracelulares ou extracelulares, como adesinas, proteases e exotoxinas ¹⁰⁰.

A relação entre resistência e virulência costuma ser considerada por muitos autores como antagônica ¹⁰¹, mas esse dado ainda é controverso.

São reconhecidamente importantes o pili, apêndices superficiais que promovem a aderência do microorganismo a receptores de gangliosídeo GM-1 presentes nas células do hospedeiro, os flagelos – também partícipes no mecanismo de aderência – e a endotoxina (lipopolissacarídeo da parede celular, i.e. LPS) responsável pela reação inflamatória sistêmica, por meio da liberação de citocinas como interleucina-1, fator de necrose tumoral e mecanismos como ativação de complemento ^{102,103}.

Dentre os fatores extracelulares cinco mecanismos merecem destaque:

1) produção de alginato, polissacarídeo responsável por maior aderência, implicado na formação de biofilmes e presente em grande quantidade em

isolados de pacientes com fibrose cística ¹⁰⁴; 2) produção de enzimas como a elastase, que degrada imunoglobulina e complemento; 3) leucocidina, que inibe formação de neutrófilos; 4) piocianina, cuja ação impede o desenvolvimento de outras bactérias e 5) toxinas como a exotoxina A que inibe a síntese proteica e promove destruição tecidual ¹⁰⁵.

Já entre as toxinas produzidas, um dos sistemas mais estudados em *P. aeruginosa* é o Sistema de Secreção Tipo III (*type three secretion system*, TTSS). Esse sistema injeta potentes citotoxinas (*ExoS*, *ExoT*, *ExoU*, ou *ExoY*) dentro da célula eucariótica, com distintos danos tissulares no hospedeiro ¹⁰⁶.

Pena e colaboradores recentemente estudaram o impacto em mortalidade da presença dos genes produtores do TTSS em pacientes que apresentaram ICS por *P. aeruginosa*. Entre os 590 pacientes analisados a mortalidade precoce ajustada para fatores de confusão foi 1,9 vezes maior nos pacientes com genótipo *ExoU* (IC 95% 1,1–3,; $p = 0,010$), enquanto a mortalidade em 30 dias não sofreu influência estatisticamente significativa. Nessa população a presença do gene *ExoU* (21% dos isolados) era menor entre as cepas MDR ¹⁰⁷.

No Brasil, três importantes atributos de virulência (biofilme, elastase e piocianina) foram estudados em 96 amostras clínicas de *P. aeruginosa* em três estados da Federação e estavam presentes em todas as amostras ¹⁰⁸.

É característica marcante dessa espécie é a capacidade de perceber mudanças ambientais, em um mecanismo que permite que a bactéria regule o tamanho de sua população a depender das condições do meio, conhecida como *Quorum sensing*. Esta é coordenada por genes que regulam a produção

dos fatores de virulência mencionados anteriormente por meio de dois sistemas principais, *las* e *rhl*¹⁰³.

Outro gene com papel importante tanto para absorção quanto para virulência é o gene *ecfX* que codifica um fator sigma de função extracitoplásmica (ECF) e é restrito a *P. aeruginosa*. As análises de especificidade e sensibilidade mostraram que o rastreio dessa espécie por meio de reação em cadeia de polimerase (polymerase chain reaction, PCR) para o gene *ecfX* era altamente confiável, com validação inclusive para extraídos ambientais de DNA¹⁰⁹.

Em isolados do HCFMUSP, o sequenciamento do genoma total bacteriano detectou a presença de inúmeros genes de virulência envolvidos na adesão da bactéria, produção de biofilme e toxinas do TTSS e mecanismo de *quorum sensing*³⁰.

A melhor compreensão e conhecimento da presença desses determinantes poderia resultar em novos potenciais alvos medicamentosos, como por exemplo o uso de inibidores em futuros tratamentos¹¹⁰.

1.12 Sequenciamento do genoma total bacteriano

Stover e colaboradores sequenciaram o genoma completo da linhagem da *P. aeruginosa* PAO1 e verificaram a presença de 6,3 milhões de pares de bases, sendo um dos maiores genomas bacterianos já sequenciados, levando os autores a acreditar que tal tamanho e complexidade sejam reflexo de adaptação evolutiva que permite à espécie crescer e resistir em diversos

ambientes¹¹¹. A análise da estrutura do patógeno revela que a *P. aeruginosa* contém um core genômico conservado e um genoma acessório composto por elementos cromossômicos como plasmídeos que se acredita adquiridos por transferência horizontal (frequentemente mediada por fagos).

O crescente acesso aos dados de sequenciamento total do genoma permite conhecimento detalhado da estrutura populacional e também da dinâmica de clones epidêmicos e não-epidêmicos^{112,113}. No entanto, o método mais popular e padronizado para análise das populações continua sendo a tipagem de sequencia multilocus da bactéria.

Trata-se de metodologia desenvolvida em 2004 de tipagem portátil que permite comparações interlaboratoriais e monitoramento em larga escala da lista crescente nacional e internacional de clones envolvidos em surtos nosocomiais cuja denominação deriva do idioma inglês *Multilocus Sequence Typing of Bacteria* (MLST)¹¹⁴.

O banco de dados MLST (<http://pubmlst.org/paeruginosa>) contém 2.662 isolados, com um total de 2106 tipos de sequência (do inglês *sequence types* STs). Embora exista o viés de depósito, como, por exemplo, disponibilidade preferencial de isolados resistentes ou de certas regiões, é uma fonte muito valiosa de informação epidemiológica.

Figura 4- Distribuição mundial dos clones de alto risco de *Pseudomonas aeruginosa* reportados na literatura. Fonte: Adaptado de Oliver et al., 2015⁷¹. FMUSP, São Paulo.

As principais linhagens internacionais já descritas em *P. aeruginosa* estão representadas na figura 4. Mais de 50% dos isolados MDR pertencem a poucos tipos clonais, com o ST235 responsável por surtos na Europa, Ásia e também América do Sul¹¹⁵. No Brasil o perfil ST277 foi reportado em isolados produtores de SPM-1, enquanto o gene de virulência *ExoU* foi encontrado no clone ST237 em isolados de pacientes queimados¹¹⁶.

1.13 Justificativa do estudo

A *P. aeruginosa* é um dos principais agentes de infecção hospitalar em todo o mundo, apresenta múltiplos mecanismos de resistência antimicrobiana, está implicada em surtos e é de difícil tratamento. Pacientes submetidos à TCTH apresentam elevada mortalidade associada com infecção por esta

bactéria, especialmente na presença de resistência a MERO. Avaliar a presença de efeito sinérgico entre combinações de antimicrobianos pode ser útil para o tratamento contra esse agente, principalmente nessa população de alto risco que frequentemente recebe terapia combinada e é exposta às múltiplas toxicidades e interações medicamentosas sem o real conhecimento do benefício ou não da associação de antimicrobianos.

2. Objetivos

2.1 Objetivo primário

- Descrever as características clínicas, microbiológicas e moleculares das infecções de corrente sanguínea por *Pseudomonas aeruginosa* resistente à meropenem e imipenem em pacientes submetidos a TCTH.

2.2 Objetivos secundários

- Avaliar a presença de efeito sinérgico *in vitro* das combinações antimicrobianas contra isolados de *P. aeruginosa* resistente à carbapenêmicos;
- Caracterizar a presença de genes produtores de carbapenemases e a clonalidade dos isolados;
- Caracterizar a presença de genes de virulência nos isolados bacterianos;
- Determinar a relação entre as características clínicas e microbiológicas analisadas e o desfecho clínico do paciente;
- Identificar genes implicados com mecanismos de resistência e genes com função de virulência e o MLST por meio do sequenciamento total de uma parcela dos isolados.

3. Materiais e Métodos

3.1 Características do Hospital e da população do estudo

O Hospital das Clínicas de São Paulo é campo de aprendizado da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) com atividades de ensino, pesquisa e assistência. Trata-se de hospital terciário que compõe a rede de atendimento à população dentro do Sistema Único de Saúde. Dentre os 800 leitos de enfermaria de 33 diferentes especialidades médicas está a Unidade de Transplante de célula-tronco hematopoética, com 18 leitos em quartos compartilhados e média de 160 transplantes por ano no período do estudo.

3.2 Delineamento do Estudo

Trata-se de estudo de coorte retrospectiva realizado entre janeiro de 2012 e dezembro de 2014.

3.3 População do Estudo

Pacientes adultos internados na Unidade de Transplante de célula-tronco hematopoética com infecção de corrente sanguínea documentada por *P. aeruginosa* resistente a meropenem e imipenem.

3.4 Definições

Sítio de infecção foi definido segundo critérios estabelecidos pelo CDC para o diagnóstico de infecção primária de corrente sanguínea¹².

Escore de gravidade: utilizou-se o escore de Pitt do dia da infecção¹¹⁷ que foi calculado com os seguintes critérios: (1) temperatura axilar: 2 pontos para temperatura $\leq 35^{\circ}\text{C}$ ou $\geq 40^{\circ}\text{C}$, 1 ponto para temperatura entre $35.1\text{--}36.0^{\circ}\text{C}$ ou $39.0\text{--}39.9^{\circ}\text{C}$ e 0 pontos para temperatura de $36.1\text{--}38.9^{\circ}\text{C}$; (2) hipotensão: 2 pontos para evento agudo com queda na pressão sistólica e diastólica >30 e >20 mmHg, respectivamente, ou uso de vasopressores intravenosos ou pressão arterial sistólica <90 mmHg; (3) necessidade de ventilação mecânica: 2 pontos; (4) parada cardíaca: 4 pontos e (5) alteração do nível de consciência: alerta, 0 pontos; desorientado, 1 ponto; torporoso, 2 pontos e comatoso, 4 pontos.

Terapia adequada: uso de pelo menos um antimicrobiano sensível *in vitro*, caracterizado pela utilização ou não de COL, iniciado nas primeiras 24 horas da coleta da hemocultura positiva e administrado por via intravenosa, na dose recomendada e ajustada quando necessário para função renal, por pelo menos 48 horas.

3.5 Dados clínicos

Foram obtidos junto ao prontuário médico eletrônico e prontuário físico dos pacientes as seguintes informações:

3.6 Dados demográficos e relacionados ao transplante

- Gênero e idade;
- Doença de base: leucemias agudas, leucemias crônicas, linfomas, mieloma múltiplo, anemia aplásica e outros;
- Estágio da doença neoplásica de base: remissão completa ou remissão parcial/progressão conforme avaliação do médico responsável pelo transplante;
- Tipo de TCTH: alogênico (aparentado ou não-aparentado) ou autólogo;
- Tempo de hospitalização até o momento da infecção (em dias);
- Data da infusão de células precursoras;
- Tempo decorrido entre a infusão de células precursoras e a infecção (em dias);
- Presença e grau de mucosite;

3.7 Dados relacionados à infecção

- Data da infecção: primeiro dia no qual a hemocultura resultou positiva para o agente em estudo. As hemoculturas eram coletadas conforme descrição do anexo 01.
- Presença ou não de infecção polimicrobiana
- Presença de neutropenia (contagem de neutrófilos <500 células/mm³) na data da infecção;
- Índice de gravidade com o cálculo do escore de Pitt na data da infecção;

A terapia empírica para neutropenia febril foi iniciada em acordo com guia institucional de uso racional de antimicrobianos do serviço¹¹⁸. Todos os pacientes faziam uso de cateter venoso central no momento da infecção.

3.8 Dados relacionados à colonização prévia

-Presença ou não de colonização prévia por *P. aeruginosa* resistente a meropenem e imipenem (anexo 02).

3.9 Desfechos

Mortalidade em 14 dias

Isolados bacterianos

Foram selecionados 30 isolados de *P. aeruginosa* enviadas prospectivamente ao banco de cepas do Laboratório de Investigação Médica (LIM) de Bacteriologia. As amostras foram previamente identificadas pelo método manual API20NE (bioMérieux, França), com leituras de 24 e 48 horas. Todas as amostras foram isoladas de pacientes internados na Unidade de TCTH do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo entre janeiro de 2012 e dezembro de 2014.

Cultivo e armazenamento

Os isolados estavam armazenados em caldo BHI (Brain Heart Infusion) acrescido de 20% de glicerol e mantidos a -80°C para preservação do microrganismo. As amostras foram cultivadas em ágar sangue de carneiro 5% e incubadas a 37°C por 24 horas no laboratório de bacteriologia (LIM-54) do Instituto de Medicina Tropical.

Linhagem controle

Para todos os ensaios foram utilizadas amostras controle, de acordo com as normas padronizadas pelo CLSI, obtidas da American Type Culture Collection (ATCC), como apresentado no Quadro 2 ¹¹⁹.

Antimicrobianos utilizados no estudo

Os antimicrobianos foram preparados considerando sua potência (atividade antimicrobiana por concentração em mg/mL) e a escolha desses antimicrobianos foi baseada nas opções terapêuticas para tratamento de infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa* no HC-FMUSP e drogas utilizadas no protocolo institucional de neutropenia febril, como a teicoplanina. Colistina (USP-Reference Standard Colistin Sulfate, Rockville, MD, USA) e meropenem (Meronem® I.V. – AstraZeneca, Cotia, SP, Brazil) foram testados combinados entre si e com sulfato de amicacina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) e teicoplanina (Targocid® I.V. Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) a fim de avaliar o efeito sinérgico dos mesmos.

Quadro 2- Cepas controle obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC) de acordo com os experimentos realizados. FMUSP, São Paulo.

Linhagem Controle		Experimento Utilizado
Micro-organismo	ATCC	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	CIM, Checkerboard, PFGE
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213	CIM

A concentração final da solução estoque para cada antimicrobiano foi de 10.000 µg/mL. Para calcular a quantidade necessária do antimicrobiano foi utilizada a seguinte equação:

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

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) por microdiluição em caldo.

As CIMs dos isolados foram determinadas para todos os isolados como análise confirmatória pelo método de microdiluição em caldo, seguindo as normas padronizadas. Cada antimicrobiano foi preparado considerando sua potência, assim como o solvente e o diluente apropriado para cada droga¹¹⁹.

Preparo das diluições em microplacas

A partir da solução estoque foram feitas diluições para obter a concentração inicial desejada. Todos os ensaios foram feitos em duplicata em momentos diferentes.

Dessa forma, 50µL de meio de cultura Caldo Mueller Hinton Cátion Ajustado (CMHCA) foram colocados em todos os poços da placa de microdiluição com fundo arredondado de 96 poços, exceto na primeira coluna. 100µL do antimicrobiano preparado com uma concentração acima da concentração inicial da placa foi colocado na coluna 1 de A a H. Com pipeta multicanal foi realizada uma diluição seriada do antimicrobiano, sendo pipetado 50µL do volume da primeira coluna e passado para os poços das colunas seguintes com homogeneização de todos os poços em cada coluna até coluna 10, deixando os 50µL restantes na coluna 12, a qual foi designada como “controle de esterilidade”, onde não foi colocada suspensão bacteriana para verificar a ocorrência de contaminação durante a diluição e preparo da droga.

Preparo da suspensão bacteriana

Foi preparada uma suspensão bacteriana na escala 0,5 de McFarland ($\sim 1,8 \times 10^8$ UFC/mL) por espectrofotometria com densidade óptica de 0,08 a 0,1 em comprimento de onda de 625nm, essa suspensão foi diluída a 1:100 em CMHCA ($\sim 1,8 \times 10^6$ UFC/mL). O mesmo foi realizado para as amostras controle.

Inoculação da suspensão bacteriana

Foram adicionados 50µL dessa diluição em todos os poços da placa exceto na coluna 12 designada para controle de esterilidade, contendo apenas CMHCA e antimicrobiano em teste, enquanto a coluna 11 foi designada para controle de crescimento. Após inoculação as placas foram fechadas, homogeneizadas e incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 18 a 24 horas.

Leitura das concentrações inibitórias mínimas

A leitura das placas para determinação das CIMs foi realizada com auxílio de um espelho para leitura de microplacas em local iluminado, de acordo com a observação macroscópica do crescimento bacteriano.

Os pontos de corte utilizados para os antimicrobianos na CIM, foram baseados em critérios estabelecidos pelo CLSI (**Quadro 3**) para *P. aeruginosa*, exceto para teicoplanina, com utilização do ponto de corte baseado nos critérios para *S. aureus*. Para as espécies testadas os pontos de corte pelos critérios do grupo europeu não trariam interpretação diferente quanto a sensibilidade ou resistência do isolado¹²⁰.

Os critérios de sensibilidade aos antimicrobianos foram baseados no CLSI para *P. aeruginosa* com exceção da teicoplanina, para a qual foi utilizado o critério para *S. aureus*¹¹⁹.

Quadro 3- Pontos de corte dos antimicrobianos utilizados para determinação da CIM de acordo com os critérios estabelecidos pelo CLSI (2013). FMUSP, São Paulo.

ATB	Cepas Controle – ATCC (µg/ml)		
	<i>P. aeruginosa</i> (27853)	<i>E. coli</i> (25922)	<i>S. aureus</i> (29213)
Colistina	0,5-4	0,25 – 2	-
Meropenem	0,25-1	0,008-0,06	-
Amicacina	1-4	0,5 – 4	-
Teicoplanina	-	-	0,25-2

Quadro 4- Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos estabelecidos pelo CLSI (2013). FMUSP, São Paulo.

ATB	Perfil de sensibilidade (µg/ml)		
	Sensibilidade	Resistência Intermediária	Resistência
Colistina	≤2	4	≥8
Meropenem	≤2	4	≥8
Amicacina	≤16	32	≥64
Teicoplanina^a	≤8	16	≥32

^aCrítérios estabelecidos pelo CLSI (2013) para *Staphylococcus aureus*.

3.10 Determinação do efeito sinérgico

As combinações antimicrobianas testadas para o método de *checkerboard* ou tabuleiro e *time-kill* foram:

- colistina X meropenem

- colistina X amicacina
- colistina X teicoplanina
- meropenem X amicacina
- meropenem X teicoplanina
- amicacina X teicoplanina

3.11 Determinação do efeito sinérgico pelo método do tabuleiro

Preparo das diluições dos antimicrobianos

Os antimicrobianos foram diluídos, a partir da solução estoque, em tubo falcon contendo 10 mL de CMHCA em concentrações 4 vezes acima da concentração desejada na placa. Em seguida foi realizada uma diluição seriada com os demais falcons contendo 5 mL de CMHCA, em número correspondente as colunas e linhas da placa de microdiluição utilizadas para o método.

A técnica foi realizada para os 30 isolados em duplicata, com seis combinações por isolado.

Preparo das placas de *checkerboard*

Foram transferidos 50 µL dos antimicrobianos, previamente diluídos, em cada concentração, para placas de microdiluição estéreis com fundo arredondado, um dos antimicrobianos foi distribuído na horizontal do mais

concentrado, na coluna 10, até o menos concentrado, na coluna 2. Um segundo antimicrobiano foi distribuído na vertical, sendo o mais concentrado da linha A até o menos concentrado na linha G. A última linha (H) e a primeira coluna (1) foram destinadas somente para um dos antimicrobianos com o intuito de determinar o CIM de cada ATB na mesma placa. Da mesma forma foram determinados na coluna 11 o controle de crescimento, contendo apenas CMHCA e suspensão bacteriana e na coluna 12 o controle de esterilidade, contendo apenas CMHCA e o volume da última diluição do ATB.

Preparo da suspensão bacteriana

O inóculo, tanto dos isolados quanto dos controles, foi preparado fazendo-se uma suspensão direta, em solução salina, de colônias isoladas selecionadas numa placa de ágar sangue de carneiro 5% com incubação de 18 a 24 horas. A suspensão foi ajustada com auxílio de um espectrofotômetro para turbidez de solução padrão 0,5 de McFarland, que contém aproximadamente $1,8 \times 10^8$ UFC/mL. Os inóculos foram diluídos na proporção 1:100 em CMHCA para obter uma concentração de 10^6 UFC/mL. Após 100 µL da suspensão bacteriana foram distribuídos em todos os poços da placa, exceto na coluna 12, destinada ao controle de esterilidade.

Leitura do *checkerboard*

A leitura do *checkerboard* foi realizada com auxílio de um espelho para leitura de microplacas em local iluminado, de acordo com a observação macroscópica do crescimento bacteriano.

Interpretação das combinações antimicrobianas

A interpretação do efeito sinérgico das combinações antimicrobianas foi realizada por dois métodos diferentes: o método de *two-well* e concentração inibitória fracional (CIF). O método de *two-well* consiste na determinação da concentração antimicrobiana de dois poços da placa contendo a combinação dos dois ATB em teste.

Para a determinação dos poços foi realizado o cálculo:

1º poço: 0,25xCIM droga A e 0,25x CIM droga B= poço com concentração específica de A+B

2º poço: 2 x CIM droga A e 2 x CIM droga B= poço com concentração específica de A+B

Quando os dois poços (com as respectivas concentrações determinada pelo cálculo) não apresentam turvação, foi considerado sinergismo antimicrobiano presente; quando somente um dos poços apresentam turvação o resultado foi considerado indiferente e a presença de turvação, ou seja, crescimento bacteriano nos dois poços, traduziu resultado antagônico ¹²¹.

Para a determinação da CIF foram calculadas:

$$CIF = CIF_A + CIF_B = \frac{CIM \text{ (droga A + droga B)}}{CIM \text{ (droga A)}} + \frac{CIM \text{ (droga B+droga A)}}{CIM \text{ (droga B)}}$$

Onde:

CIF_A = CIM da droga A em combinação dividido pelo CIM da droga A sozinha;

CIF_B = CIM da droga B em combinação dividido pelo CIM da droga B sozinha.

A interpretação foi realizada da seguinte forma: índice CIF $\leq 0,5$ sinergismo; CIF entre 0,5 e 4 indiferença e antagonismo como CIF ≥ 4 .

3.12 Determinação do efeito sinérgico por *Time-kill*

Em contraste com o método do tabuleiro que fornece dados inibitórios, a técnica de *time-kill* ou curva de morte bacteriana avalia a atividade microbida da combinação testada.

O estudo foi realizado em duplicata, em diferentes períodos de tempo, com os mesmos antimicrobianos utilizados para determinação da CIM e para técnica do tabuleiro, seguindo o protocolo modificado¹²².

As concentrações utilizadas para o ensaio foram determinadas com base na CIM do método de *checkerboard*, e foram testadas, para todos os isolados, concentrações referentes a 1 x CIM e 0,5 x CIM.

Preparo do teste de *time-kill*

Para cada isolado foram preparados quatro tubos falcon, de 10 mL cada contendo CMHCA juntamente com suspensão bacteriana na escala 0,5 de McFarland e os antimicrobianos nas concentrações do CIM pré-determinadas pelo método de *checkerboard*, onde, o primeiro tubo apresentava a droga A sozinha, o segundo tubo a droga B sozinha, o terceiro tubo a combinação da droga A e B na mesma concentração da CIM ($1 \times \text{CIM}$), o quarto tubo a combinação da droga A e B na metade da concentração do CIM ($0,5 \times \text{CIM}$) e o quinto tubo somente o isolado na presença do meio de cultura para controle de crescimento. Os tubos foram incubados a 37 °C, em shaker a 150 rpm, e nos períodos 0 (momento do preparo), 2, 4, 6 e 24 horas uma alíquota de cada tubo foi diluída a 1:10, 1:100 e 1:1000 em salina, para cada diluição, 10 µL foram dispensados em placas de ágar Muller Hinton e semeados em três sentidos diferentes. As placas foram incubadas a 37 °C por 20-24 horas para contagem de colônias.

Interpretação do *time-kill*

O sinergismo foi interpretado como diminuição $\geq 2 \log_{10}$ na contagem de colônias em combinação de antimicrobianos quando comparados com o tempo 0 (primeiro período de incubação); o antagonismo foi considerado como aumento $\geq 2 \log_{10}$ na contagem de colônias e indiferente para aumento ou diminuição $< 2 \log_{10}$ na contagem de colônias com a combinação¹²³.

3.13 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A reação de PCR foi realizada para determinação de genes de resistência a carbapenêmicos e genes que codificam fatores de virulência.

A extração do DNA genômico dos isolados bacterianos foi realizada por meio do kit de extração Illustra Bacteria Genomic Prep Mini Spin Kit - GE® Healthcare, seguindo as orientações do fabricante.

As sequências específicas de DNA foram amplificadas por PCR, os pares de iniciadores, assim como suas respectivas temperaturas de anelamento estão listados no **Quadro 5**.

Cada reação foi realizada com controle interno positivo, para o determinado gene, e controle negativo. As reações de amplificação ocorreram em termociclador Mastercycler Nexus GSX 1. Os produtos amplificados pela PCR foram submetidos a eletroforese (gel de agarose 1%, coloração com Syber Safer) e fotodocumentado com Alpha Innotech – Alphalmager.

Amplificação dos genes de carbapenemases

A detecção dos genes codificadores de metalo- β -lactamases (VIM, KPC, SPM e NDM) foi realizada para cada gene separadamente, nas condições padronizadas conforme referências descritas no Quadro 5: desnaturação 94°C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, a temperatura de anelamento dos respectivos iniciadores por 45

segundos e 72 °C por 30 segundos, a extensão final foi realizada a 72 °C por 10 minutos.

Amplificação dos genes codificadores de fatores de virulência

Foram pesquisados os genes que codificam a produção das enzimas como protease alcalina, , elastase B e exotoxina A. A amplificação de quatro genes (*toxA*, *phzM*, *lasB* e *ExoS*) e um gene para controle interno (*ecfX*) seguiu as condições e iniciadores descritos por Shi e colaboradores¹²⁴.

Quadro 5- Sequência de oligonucleotídeos e suas respectivas temperaturas de anelamento utilizadas no estudo. FMUSP, São Paulo.

Iniciador	Sequência de Oligonucleotídeos (5'-3')	T°	Tamanho(pb)	Referência
<i>bla_{SPM}</i>	F- CCTTTTCCGCGACCTTGATC R- ATGCGCTTCATTACGCAC	59	798	(125)
<i>bla_{VIM}</i>	F- TTTGGTTCGCATATCGCAAAG R- CCATTCAGCCCAGATCGGCAT	60	382	(125)
<i>bla_{KPC}</i>	F- ATGTCACTGTATCGCCGTCT R- TTTTCAGAGCCTTACTGCC	59	798	(126)
<i>bla_{NDM}</i>	F- GGCGGAATGGCTCATCACGA R- CGCAACACAGCCTGACTTTC	60	375	(127)

T°: temperatura de anelamento; F: forward; R; reverse.

Quadro 6- Sequência de oligonucleotídeos e suas respectivas temperaturas de anelamento utilizadas no estudo para genes codificadores de fatores de virulência. FMUSP, São Paulo.

Locus	Iniciador	Sequencia de oligonucleotídeos	Tamanho (pb)
<i>ExoS</i>	EXOS240-F	CATCCTCAGGCGTACATCCT	240
	EXOS240-R	ATCGATGTCAGCGGGATATC	
	EXOS276-F	CCTTCCCTCCTTCCCCCCCATCCTCAGGCGTACATCCT	276
	EXOS276-R	CCTTCCCTCCTTCCCCCCCATCGATGTCAGCGGGATATC	
<i>lasB</i>	ELA520-F	ACATCGCCCAACTGGTCTAC	520
	ELA520-R	ACCAGCGGATAGAACATGGT	
	ELA556-F	CCTTCCCTCCTTCCCCCACATCGCCCAACTGGTCTAC	556
	ELA556-R	CCTTCCCTCCTTCCCCCACAGCGGATAGAACATGGT	
<i>toxA</i>	ETA397-F	ATGGTGTAGATCGGCGACAT	397
	ETA397-R	AAGCCTTCGACCTCTGGAAC	

<i>phzM</i>	ETA433-F	CCTTCCCTCCTTCCCCCATGGTGTAGATCGGCGACAT	433
	ETA433-R	CCTTCCCTCCTTCCCCCAAGCCTTCGACCTCTGGAAC	
	PYO330-F	CGGCGAAGACTTCTACAGCT	330
	PYO330-R	AGGTAGATATCGCCGTTGGA	
<i>ecfX</i>	PYO366-F	CTTCCCTCCTTCCCCCGGCGAAGACTTCTACAGCT	366
	PYO366-R	CCTTCCCTCCTTCCCCCAGGTAGATATCGCCGTTGGA	
	ECF164-F	ATGCCTATCAGGCGTTCCAT	164
	ECF164-R	GGCGATCTGGAAAAGAAATG	
	ECF200-F	CCTTCCCTCCTTCCCCCATGCCTATCAGGCGTTCCAT	200
	ECF200-R	CCTTCCCTCCTTCCCCCGGCGATCTGGAAAAGAAATG	

3.14 Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

A eletroforese convencional de moléculas de DNA é realizada aplicando-se amostras de preparados de DNA em uma matriz sólida de agarose e induzindo estas moléculas a migrar através do gel sob campo elétrico estático. A separação das moléculas através do gel depende predominantemente do peso molecular dos mesmos, num processo que utiliza campos elétricos que são ativados alternadamente ¹²⁸. A técnica foi aplicada para os 30 isolados.

Preparo da suspensão bacteriana

As amostras foram semeadas em ágar sangue de carneiro a 5% e incubadas por 18 a 24 horas a 37 °C. Três a cinco colônias do crescimento foram inoculadas em 3 mL de caldo tripton de soja (TSB) e incubadas overnight a 150 rpm em shaker a 37 °C. Microtubos foram identificados e pesados. O volume do crescimento em TSB foi transferido para os microtubos

pré-pesados. Esses foram centrifugados por 20 min a 11.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e adicionado 1 mL de solução fisiológica estéril ao sedimento sendo homogeneizado com vórtex. O mesmo processo foi realizado por mais 3 vezes.

Após a última lavagem, foi retirado totalmente o sobrenadante e o microtubo foi pesado com o sedimento. Em seguida, a massa bacteriana obtida foi calculada e preparada uma suspensão bacteriana na concentração de 100 µg/µL com EDTA 25 mM pH 8,0. A equalização do volume foi realizada subtraindo o peso do microtubo com sedimento pelo peso do microtubo vazio.

Preparo dos blocos de agarose

Após a fundição da agarose low melting 2% em 0,5 x solução Tris, Ácido Bórico, EDTA (TBE), esta foi deixada no termo-bloco (AccuBlock Digital Dry Bath – Labnet International) a 56 °C, aquecido previamente. Microtubos contendo 225 mL de tampão TEN (TRIS 1M, EDTA 0,5M, NaCl 4M), foram identificados. A esse tampão foi adicionado 25 µL da suspensão bacteriana, os microtubos foram homogeneizados em vórtex e colocados no termo-bloco a 56 °C por 1 hora. Foi adicionada a suspensão 70 µL de lisozima a 20 mg/mL, em seguida adicionado 350 µL da agarose e homogeneizado com pipeta. A mistura foi distribuída nos moldes para os blocos, que foram resfriados em geladeira por 30 minutos.

Preparo da extração do DNA bacteriano

Foram distribuídos 2mL de tampão EC (EDTA 0,5M, TRIS 1M, NaCl, N-lauril-sarcosyl, BRIJ, Deoxicolato de Sódio) nos poços de uma placa de cultura de células de 24 poços, os blocos de agarose foram removidos dos moldes no tampão EC e incubados por 5 horas a 37 °C sob agitação suave (75 rpm). Em seguida foi retirado o tampão EC e adicionado 2 mL de tampão CHEF-TE (EDTA 0,5M, TRIS-HCl 1M). O mesmo foi retirado e adicionado novamente 2 mL deste tampão, que foi mantido a temperatura ambiente por 30 minutos. Após esse período o tampão CHEF-TE foi retirado e adicionado 2 mL de tampão ES (EDTA 625mM, N-lauril-sarcosyl 5%) acrescido de 100 µL de proteinase K a 20 mg/mL em cada poço e homogeneizado. As placas foram incubadas a 52 °C overnight.

Retirado o tampão ES os blocos foram lavados 5 vezes com 2 mL de CHEF-TE. A primeira lavagem não teve incubação, as demais foram feitas com intervalos de 60 min sob agitação leve (75 rpm). Após a última lavagem foi trocado o tampão CHEF-TE e as placas guardadas sob refrigeração (4 °C).

Restrição enzimática

Foi adicionado 200 µL de tampão DNS (TRIS 1M, MgCl) nos poços de uma placa de 96 poços. Com auxílio de uma espátula e bisturi, um bloco foi cortado ao meio e colocado no tampão DNS. Retirado o tampão DNS foram realizadas 5 lavagens com intervalos de 60 minutos cada. O tampão DNS foi

substituído por 100 µL de tampão com enzima de restrição *Apal* (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, USA) e incubadas a 37 °C por 16 horas.

Preparo do gel de agarose e tampão TBE 0,5 x para corrida

Para o pente de 30 amostras, foram preparados 100 mL de agarose 1% com TBE 0,5 x. O percentual de agarose é determinante para o tamanho dos fragmentos que se pretende separar. Os blocos com DNA, assim como peso molecular de 50-1000 pares de bases (Lambda Ladder PFG Marker, Biolab, Austria, Europe - GMBH), foram colocados no pente e, em seguida, a agarose foi distribuída no molde sem formar bolhas para solidificar.

Quadro 7- Condições de corrida estabelecidas para PFGE de *P. aeruginosa* em CHEF DRIII – BioRad. FMUSP, São Paulo.

Agarose (%)	Switch time (segundos)	Volts/ cm	Ângulo	Tempo		Fragmento (Kb)
				de Corrida	Temperatura	
1	1-90	6	120°	24 horas	13°C	100-650

Foram preparados 2 litros de TBE 0,5 x, acrescentado 200 µL de tiuréia 0,5 M, o tampão foi colocado na cuba para refrigerar e as condições de corrida foram ajustadas com os dados contidos no Quadro 7. O gel foi corado, após a corrida, em solução de brometo de etídio 1 µg/mL por 20 minutos e fotodocumentado em Alpha Innotech - Alphalmimage.

Interpretação do PFGE

Os perfis eletroforéticos gerados foram agrupados utilizando o *software* de bioinformática BioNumerics versão 7.1 (Applied Maths). Fragmentos de DNA foram manualmente curados e normalizados usando o peso Lambda Marker presentes em cada gel. Uma tolerância de 1,5% e otimização de 0,5% foram utilizadas para a comparação de diferentes géis (Seifert et al., 2005). O agrupamento de clusters foi realizado pelo método de Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) e coeficiente de similaridade Dice, com a geração de um dendrograma.

Para definição dos perfis clonais e subtipos encontrados, três níveis de *cut off* foram seguidos: isolados com similaridade <80% foram considerados diferentes perfis. Os subtipos foram definidos a partir dos perfis com coeficiente Dice entre 80-95%. Isolados com similaridade >95% foram considerados idênticos¹²⁹.

Fragmentos de DNA da cepa padrão de *P. aeruginosa*, ATCC 27853, foi incluída na análise.

3.15 Sequenciamento do genoma total bacteriano por *Illumina*

Dentre os 30 isolados de *P. aeruginosa*, oito isolados selecionados com base no perfil molecular foram submetidos ao sequenciamento total do genoma pela plataforma MiSeq IlluminaTM.

A metodologia envolvida nesta análise genômica foi feita no Laboratório de Investigação Médica – 15 (LIM-15) da rede premium de multiusuários da USP, locado na Faculdade de Medicina da USP sob supervisão da Profa. Dra. Suely K. N. Marie.

O DNA total foi extraído com o kit Illustra Bacteria Genomic Prep Mini Spin (GE Healthcare Bio-Sciences Corp, USA). A qualidade do DNA foi verificada utilizando-se o espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific, Delaware, USA) e a concentração do DNA foi verificada utilizando-se o fluorômetro Qubit^R (Thermo Scientific, Delaware, USA). A integridade do DNA foi verificada em gel de agarose 1,5%.

As bibliotecas foram preparadas com o kit comercial Nextera XT IlluminaTM de acordo com as instruções do fabricante. A qualidade das bibliotecas construídas foi avaliada em sistema Tape Station (Agilent) e posteriormente processados na plataforma de sequenciamento MiSeq IlluminaTM (corrida com cartucho V3).

A qualidade dos arquivos gerados no sequenciamento foi avaliada pelos programas FastQC versão 0.11.3 e Trimmomatic versão 0.33. A montagem do genoma *de novo*, foi realizada com o programa Velvet Optimiser versão 2.2.5. Os *contigs* foram ordenados por Abacas v. 1.3.1¹³⁰. A anotação do genoma foi realizada com auxílio do programa Prokka versão 1.11¹³¹. A análise do sequenciamento genômico foi realizada por meio do *Align Sequences Nucleotide* BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) e *ResFinder* 2.0 servers, disponível gratuitamente no site <http://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/> por meio do alinhamento de sequencias genéticas depositadas no *GeneBank*¹³².

Posteriormente aos resultados gerados por essas ferramentas, a presença dos genes foi confirmada por curadoria manual das CDSs e seus respectivos genes, com o uso do programa Artemis 16.0.0.

Determinação do MLST

A determinação dos Tipos de Sequencia (ST) foi realizada por meio do banco de dados PubMLST Oxford (<http://pubmlst.org/paeruginosa/>) para os seis isolados sequenciados. Os alelos adquiridos por meio do sequenciamento genômico foram submetidos ao banco de dados para a determinação dos ST.

3.16 Análise Estatística

Inicialmente realizou-se uma análise descritiva geral para a amostra de 28 pacientes e 30 isolados bacterianos, com apresentação das médias ou proporções no caso das variáveis contínuas ou categóricas, respectivamente, com o uso do teste do qui-quadrado ou exato de Fisher para as últimas e, para as variáveis contínuas, o teste da soma dos postos de Wilcoxon-Mann-Whitney.

Para o tempo de sobrevida intra-hospitalar foi estimada a sobrevida segundo as características de interesse com uso da função Kaplan-Meier e comparadas as sobrevidas entre as categorias com uso de testes log-rank¹³³.

Foram estimados os Hazard Ratios (HR) com os respectivos intervalos de confiança 95% com uso da regressão de Cox bivariada.

As análises foram realizadas no SPSS 20 (Chicago, IL, USA) e Stata 13.0 (StataCorp. College Station, TX: StataCorp LP).

Os testes foram realizados com nível de significância de 5% bicaudal¹³⁴.

3.17 Aspectos Éticos

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da FMUSP, pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da FMUSP sob o número 11518 e aprovado na Plataforma Brasil da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) (anexo 03).

4. Resultados

4.1 População do estudo

Dentre os 43 casos de infecção de corrente sanguínea por *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a imipenem e meropenem ocorridos em pacientes transplantados na unidade de TCTH do HCFMUSP no período compreendido entre janeiro de 2012 e dezembro de 2014, 13 não puderam ser analisados por não armazenamento dos isolados ou contaminação dos mesmos.

Dessa forma, 30 isolados foram incluídos para as análises microbiológicas. Porém para análises clínicas dois pacientes que tiveram o transplante postergado em decorrência da infecção ainda no período de condicionamento foram excluídos. Ambos evoluíram a óbito em decorrência da infecção. Outros três pacientes que morreram nas primeiras 24 horas e antes do uso de ao menos uma droga plenamente ativa contra a bactéria foram excluídos das análises referentes ao tratamento empregado, resultando em um total de 25 pacientes nessa última etapa, conforme Figura 5.

Figura 5- Avaliação dos critérios de inclusão dos pacientes com infecção de corrente sanguínea (ICS) por *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenêmicos em pacientes submetidos a transplante de célula-tronco hematopoiética (TCTH) em cada uma das etapas de análise microbiológica, clínica e de tratamento. FMUSP, São Paulo.

4.2 Distribuição temporal dos casos

No período do estudo a distribuição mensal da ocorrência de infecções de corrente sanguínea está apresentada no Gráfico 1, abaixo:

Gráfico 1- Distribuição mensal da ocorrência de 28 casos de infecção de corrente sanguínea (ICS) por *Pseudomonas aeruginosa* entre pacientes transplantados de célula-tronco hematopoiética entre janeiro de 2012 e dezembro de 2014. FMUSP, São Paulo.

4.3 Características clínicas da população do estudo

Os 28 pacientes acometidos eram em sua maioria do gênero feminino (64%) e adultos jovens, com mediana de idade de 48 anos. Leucemia aguda foi a doença de base mais comum (43%), seguida por linfomas (21%). A maior proporção (79%) dos pacientes tinham doença em remissão parcial ou progressão e o tipo de transplante mais comumente realizado foi o alogênico (68%).

No momento da infecção todos os pacientes faziam uso de cateter venoso central de longa permanência, a maioria dos pacientes (26/28) estava neutropênica e, embora tal informação não estivesse disponível em seis pacientes, 77% apresentavam mucosite (17/22). A mediana do escore de Pitt

para gravidade da ICS na data da infecção foi de zero; com 14% dos pacientes com escore ≥ 4 .

Tabela 3- Características demográficas e clínicas dos 28 pacientes receptores de TCTH com infecção de corrente sanguínea por *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenêmicos. FMUSP, São Paulo.

Características clínicas	Total pacientes n=28 (%)
Sexo	
Feminino	18 (64)
Idade (anos)	
Mediana (mín - máx)	48 (16-63)
Doença de base	
Leucemia aguda	12 (43)
Linfomas	6 (21)
Mieloma múltiplo	5 (18)
Aplasia de medula	4 (14)
Outras	1 (3)
Situação da doença de base	
Remissão completa	6 (21)
Remissão parcial ou progressão	22 (79)
Tipo de TCTH	
Autólogo	9 (32)
Alogênico	19 (68)
Tempo de internação até a infecção (dias)	
Mediana (mín - máx)	19 (4 – 64)
Tempo entre o transplante e a infecção (dias)	
Mediana (mín - máx)	10 (0 – 87)
Neutropenia	
Sim	26 (93)
Mucosite [#]	
Sim	17/22 (77)
Escore de Pitt de gravidade	
Mediana (mín-max)	0 (0-12)
Pacientes com escore ≥ 4	4 (14)
Colonização prévia [#]	
Sim	8/25 (32)
Tratamento adequado	
Sim	16 (57)
Infecção polimicrobiana	3 (9)
Mortalidade em 14 dias	19 (68)

[#] Variável avaliada em 22 e 25 pacientes, respectivamente por falta de informação em prontuário.

Sessenta e oito por cento dos pacientes não era colonizado previamente à infecção. A mediana do tempo de hospitalização até a ocorrência da infecção foi de 19 dias, dados estes apresentados na Tabela 3.

A mortalidade em 14 dias foi 68% (19/28) e 95% dos óbitos ocorreram nos primeiros 7 dias após a infecção (18/19).

Três pacientes faleceram antes do início de alguma droga plenamente ativa contra a bactéria. Dentre os 25 pacientes efetivamente tratados, 57% receberam antimicrobiano nas primeiras 24 horas após a coleta da hemocultura.

O tempo entre a infusão de células precursoras e a infecção foi de 10 dias (mínimo 0 e máximo 87 dias).

As infecções ocorreram em sua maioria no período precoce do transplante, antes da enxertia medular, sendo que 80% das ICS ocorreram até o décimo-segundo dia após a infusão das células. Dessa forma, dados de presença de doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) não foram analisados, uma vez que a maioria das infecções ocorreu em período anterior à fase na qual tal complicação ocorre mais comumente.

4.4 Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e determinação da presença de genes de resistência

O perfil de sensibilidade, determinado por microdiluição em caldo, dos 30 isolados é apresentado na **Tabela 4**, seguindo os critérios determinados pelo CLSI de acordo com o **Quadro 4**. A maioria apresentou CIM elevadas

para MERO (CIM50 > 256 e CIM90 > 512 ug/ml), vinte eram resistentes a AMK (CIM50 e CIM90 > 512 ug/ml) e os quatro últimos isolados apresentaram sensibilidade reduzida a colistina (CIM50 >0,5 e CIM90 > 1 ug/ml). Todos os isolados foram resistentes a teicoplanina.

A pesquisa da presença de genes associados com produção de carbapenemases foi positiva na maioria dos isolados. O gene mais identificado foi *bla_{SPM}* em 82% dos trinta isolados. Seis apresentaram os genes *bla_{KPC}* e *bla_{SPM}* concomitantemente, enquanto os genes *bla_{VIM}* e *bla_{NDM}* não foram identificados.

Tabela 4- Concentração inibitória mínima (CIM) em µg/mL pelo método de microdiluição em caldo dos antimicrobianos incluídos na pesquisa para os 30 isolados de *Pseudomonas aeruginosa* e carbapenemases detectadas por PCR. FMUSP, São Paulo.

ID	Amicacina		Colistina		Meropenem		Teicoplanina ^a	
1	512	R	0,5	S	256	R	>64	R
2	4	S	0,5	S	512	R	>64	R
3	4	S	0,5	S	256	R	>64	R
4	2	S	0,5	S	16	R	>64	R
5	4	S	1	S	512	R	>64	R
6	4	S	1	S	512	R	>64	R
7	4	S	1	S	512	R	>64	R
8	8	S	0,5	S	512	R	>64	R
9	512	R	0,5	S	256	R	>64	R
10	512	R	1	S	256	R	>64	R
11	512	R	1	S	512	R	>64	R
12	512	R	1	S	256	R	>64	R
13	512	R	0,5	S	256	R	>64	R
14	512	R	0,5	S	256	R	>64	R
15	512	R	1	S	512	R	>64	R
16	512	R	0,5	S	256	R	>64	R
17	512	R	0,5	S	>256	R	>64	R
18	512	R	1	S	256	R	>64	R
19	512	R	1	S	512	R	>64	R
20	512	R	1	S	256	R	>64	R
21	512	R	0,5	S	256	R	>64	R
22	8	S	0,5	S	512	R	>64	R
23	4	S	0,5	S	512	R	>64	R
24	256	R	0,5	S	256	R	>64	R
25	256	R	0,5	S	256	R	>64	R
26	8	S	0,5	S	512	R	>64	R
27	512	R	4	I	512	R	>64	R
28	512	R	4	I	512	R	>64	R
29	512	R	4	I	512	R	>64	R
30	512	R	4	I	512	R	>64	R

ID: identificação dos isolados; R: resistente; S: sensível e I: sensibilidade intermediária. ^aPonto de corte CLSI: referência para *Staphylococcus aureus*.

Dentre os 30 isolados clínicos, 21 apresentavam todos os 5 genes determinantes de fatores de virulência pesquisados (Tabela 9). Somente o gene *lasB* foi encontrado em menor proporção (83%).

4.5 Perfil molecular dos isolados por PFGE

A Figura 6 apresenta o dendograma de avaliação da variabilidade genética dos 30 isolados de *P. aeruginosa*. Foram determinados cinco clones por meio desta análise, com predomínio do clone A (16/30).

Figura 6- Dendograma de acordo com PFGE para os 30 isolados de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenêmicos com informações de data de coleta, clone e presença ou ausência de genes de resistência a carbapenêmicos. FMUSP, São Paulo.

4.6 Análise do sequenciamento genoma total e determinação do MLST

O sequenciamento do genoma total bacteriano realizado em oito isolados mostrou que todos os clones abrigavam o gene *bla*_{SPM-1} (exceto o isolado 14). A análise revelou a presença de diversos genes relacionados à resistência a aminoglicosídeos, beta-lactâmicos, quinolonas, fenicóis e sulfonamidas.

Em relação aos genes de virulência, todas as cepas abrigaram genes envolvidos na detecção de *quorum-sensing*, formação de biofilme, adesão e processo de invasão e citotoxicidade.

Todos isolados apresentavam o transposon Tn4371 e pertenciam ao ST277, dados apresentados na Tabela 5.

4.7 Determinação dos efeitos das combinações antimicrobianas pelo método do tabuleiro (*checkerboard*)

O estudo das proteínas da membrana externa mostrou a presença das mesmas mutações nas porinas e em partes das bombas de efluxo presentes nas cepas: MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexGHI-OpmD. As mutações também foram encontradas no ativador pós-transcrição da bomba de efluente MexEF-OprN e nas PBPs.

A avaliação do efeito sinérgico das combinações nos 30 isolados de *P. aeruginosa*, realizado pelo método do tabuleiro foi determinada pelos métodos de interpretação com *two-well* e cálculo da CIF.

Tabela 5- Genes relacionados com resistência a antimicrobianos e fatores de virulência determinados pelo sequenciamento do genoma total de 8 isolados de *Pseudomonas aeruginosa* em infecções de corrente sanguínea. FMUSP, São Paulo – Brasil 2018.

Número isolado	Tn	Genes de Resistência	Genes de virulência						
Ano, Clone	4371		Quorum-sensing	Biofilme	Adesão	Citotoxicidade e	SST III	Fenazinas e Operons	ST
1 2012, D	Pos	<i>aacA4, aac(6')Ib-cr, aadA7, aph(3')-Iib, bla_{OXA-50}, bla_{OXA-56}, bla_{PAO}, bla_{SPM-1}, catB7, cmx, fosA, rmtD, sul1</i>	<i>gacA, gacS, ladS, lasB</i>	<i>bfmR, bfmS, qscR, qteE</i>	<i>lecB</i>	<i>exoS, exoY, toxA</i>		<i>phzM</i>	277
8 2012, A	Pos	<i>aacA4, aac(6')Ib-cr, aadA7, aph(3')-Iib, bla_{OXA-50}, bla_{OXA-56}, bla_{PAO}, bla_{SPM-1}, catB7, cmx, fosA, sul1</i>	<i>gacA, gacS, ladS, lasB</i>	<i>bfmR, bfmS, qscR, qteE</i>	<i>csuD, lecB</i>	<i>exoS, exoT, exoY, toxA</i>		<i>phzM</i>	277
10 2012, A	Pos	<i>aacA4, aac(6')Ib-cr, aadA7, aph(3')-Iib, bla_{OXA-50}, bla_{OXA-56}, bla_{PAO}, bla_{SPM-1}, catB7, cmx</i>	<i>gacS, ladS, lasA, lasB</i>	<i>bfmS, qscR</i>	<i>lecB</i>	<i>exoS, toxA</i>		<i>phzM</i>	277
13 2012, C	Pos	<i>aacA4, aac(6')Ib-cr, aadA7, aph(3')-Iib, bla_{OXA-50}, bla_{OXA-56}, bla_{PAO}, bla_{SPM-1}, catB7, cmx, fosA, rmtD, sul1</i>	<i>gacA, gacS, ladS, lasA, lasB</i>	<i>bfmR, bfmS, qscR, qteE</i>	<i>lecB</i>	<i>exoS, exoY, toxA</i>		<i>phzM</i>	277
14 2012, D	Pos	<i>aacA4, aac(6')Ib-cr, aadA7, aph(3')-Iib, bla_{OXA-50}, bla_{OXA-56}, bla_{PAO}, catB7, cmx, fosA, rmtD, sul1</i>	<i>gacA, gacS, ladS, lasB</i>	<i>bfmR, bfmS, qscR, qteE</i>	<i>csuD, lecB</i>	<i>exoS, exoT, exoY, toxA</i>		<i>phzM</i>	277
15 2012, D	Pos	<i>aacA4, aac(6')Ib-cr, aadA7, aph(3')-Iib, bla_{OXA-50}, bla_{OXA-56}, bla_{PAO}, bla_{SPM-1}, catB7, cmx, fosA, rmtD, sul1</i>	<i>gacA, gacS, ladS, lasB</i>	<i>bfmR, bfmS, qscR, qteE</i>	<i>csuD, lecB</i>	<i>exoS, exoT, exoY, toxA</i>		<i>phzM</i>	277
19 2013, A	Pos	<i>aacA4, aac(6')Ib-cr, aadA7, aph(3')-Iib, bla_{OXA-50}, bla_{OXA-56}, bla_{PAO}, bla_{SPM-1}, catB7, fosA, rmtD, sul1</i>	<i>gacA, gacS, ladS, lasA, lasB</i>	<i>bfmR, bfmS, qscR</i>	<i>lecB</i>	<i>exoS, exoY, toxA</i>		<i>phzM</i>	277
28 2014, B	Pos	<i>aacA4, aac(6')Ib-cr, aadA7, aph(3')-Iib, bla_{OXA-50}, bla_{OXA-56}, bla_{PAO}, bla_{SPM-1}, catB7, fosA, sul1</i>	<i>gacA, gacS, ladS, lasA, lasB</i>	<i>bfmR, bfmS, qscR</i>	<i>lecB</i>	<i>exoS, exoT, exoY, toxA</i>		<i>phzM</i>	277

Tabela 6- Distribuição de mutações relacionadas com alterações na membrana externa bacterianas e presentes na análise do sequenciamento do genoma total bacteriano de 8 isolados de *Pseudomonas aeruginosa* em infecção de corrente sanguínea. FMUSP, São Paulo.

	Isolado	8	13	15	14	10	1	19	28
Membrana externa	Clone	A	A	A	B	C	D	D	D
OprD		T103S, K115T, V118P, F170L	T103S, K115T, V118P, F170L	T103S, K115T, V118P, F170L	T103S, K115T, V118P, F170L	T103S, K115T, V118P, F170L	T103S, K115T, V118P, F170L	T103S, K115T, V118P, F170L	T103S, K115T, V118P, F170L
OprE									
OprM		A261T	A261T	A261T	A261T	A261T	A261T	A261T	A261T
MexD		E257Q, S845A	E257Q, S845A	E257Q, S845A	E257Q, S845A	E257Q, S845A	E257Q, S845A	E257Q, S845A	E257Q, S845A
OprJ		D68G, M69V	D68G, M69V	D68G, M69V	D68G, M69V	D68G, M69V	D68G, M69V	D68G, M69V	D68G, M69V
MexE		P397Q, A407V	P397Q, A407V	P397Q, A407V	P397Q, A407V	P397Q, A407V	P397Q, A407V	P397Q, A407V	P397Q, A407V
MexI		A782E	A782E	A782E	A782E	A782E	A782E	A782E	A782E
OpmD		L381R	L381R	L381R	L381R	L381R	L381R	L381R	L381R
MexT		F94I, I263F, D267E	F94I, I263F, D267E	F94I, I263F, D267E	F94I, I263F, D267E	F94I, I263F, D267E	F94I, I263F, D267E	F94I, I263F, D267E	F94I, I263F, D267E
ampD		G148A, S175L	G148A, S175L	G148A, S175L	G148A, S175L	G148A, S175L	G148A, S175L	G148A, S175L	G148A, S175L
PBP1a		E53K, S632I, A615_D616insP	E53K, S632I, A615_D616insP	E53K, S632I, A615_D616insP	E53K, S632I, A615_D616insP	E53K, S632I, A615_D616insP	E53K, S632I, A615_D616insP	E53K, S632I, A615_D616insP	E53K, S632I, A615_D616insP
PBP1b		S25G, A109T	S25G, A109T	S25G, A109T	S25G, A109T	S25G, A109T	S25G, A109T	S25G, A109T	S25G, A109T
PBP4		A394P	A394P	G404P	A394P	A394P	A394P	G404P	G404P

Dentre as seis combinações realizadas entre os diferentes antimicrobianos, determinou-se efeito sinérgico entre MERO com AMK (30%) seguido por COL com MERO (3%). Não houve sinergismo entre COL e AMK (**Tabela 7**). Nenhuma combinação com teicoplanina apresentou efeito sinérgico. Pelo método de CIF a combinação resultou indiferente entre todas as drogas testadas. Não foi observado efeito antagônico em nenhuma combinação para ambos métodos de interpretação.

4.8 Determinação dos efeitos das combinações antimicrobianas pelo método de *time-kill*

O teste de *time-kill* foi realizado para todos os isolados (n=30) de *P. aeruginosa*. A **Tabela 8** apresenta o resultado encontrado com as diferentes combinações antimicrobianas.

Nas combinações antimicrobianas testadas nas concentrações de 1 × CIM (dado não apresentado) e 0,5 × CIM, apresentaram efeito sinérgico 56% dos isolados com COL mais MERO, 33% (10/30) com MERO mais AMK e somente 2 isolados na combinação COL com AMK (6,6%).

Tabela 7- Resultado da pesquisa de efeito sinérgico ou indiferente das combinações antimicrobianas realizada pelo método de *checkerboard* e interpretada pelo método de two-well contra 30 isolados de *P. aeruginosa*. FMUSP, São Paulo.

Isolados	Combinações					
	COL + MERO	COL + AMK	MERO+ AMK	COL + TEICO	TEICO + AMK	TEICO+ MERO
1						
2			S			
3			S			
4						
5			S			
6			S			
7			S			
8			S			
9						
10						
11						
12						
13						
14						
15						
16						
17						
18						
19						
20						
21						
22			S			
23			S			
24						
25						
26			S			
27						
28						
29						
30	S					

COL:Colistina; MERO: meropenem; AMK: amicacina; TEICO:teicoplanina, I: indiferente, S: sinérgico

Tabela 8- Resultado da análise de sinergismo pelo método de *time-kill* para diferentes combinações antimicrobianas testadas contra 30 isolados de *P. aeruginosa* resistente a carbapenêmicos. FMUSP, São Paulo.

Isolado	[] Combinação	EFEITO BACTERICIDA					
		Colistina X Meropenem	Colistina X Amicacina	Meropenem X Amicacina	Colistina X Teicoplanina	Teicoplanina X Amicacina	Teicoplanina X Meropenem
1	0.5xCIM	S	I	RC 24h	RC 24h	I	RC 24h
2	0.5xCIM	S	RC 24h	S	RC 24h	I	RC 24h
3	0.5xCIM	RC 24h	RC 24h	S	RC 24h	I	RC 24h
4	0.5xCIM	S	RC 24h	S	RC 24h	I	RC 24h
5	0.5xCIM	RC 24h	RC 24h	S	RC 24h	I	RC 24h
6	0.5xCIM	RC 24h	RC 24h	S	RC 24h	I	RC 24h
7	0.5xCIM	S	I	S	RC 24h	I	RC 24h
8	0.5xCIM	S	RC 24h	S	RC 24h	I	RC 24h
9	0.5xCIM	RC 24h	I	RC 24h	RC 24h	I	RC 24h
10	0.5xCIM	RC 24h	I	RC 24h	RC 24h	I	RC 24h
11	0.5xCIM	RC 24h	I	RC 24h	RC 24h	I	RC 24h
12	0.5xCIM	RC 24h	I	RC 24h	RC 24h	I	RC 24h
13	0.5xCIM	RC 24h	I	RC 24h	RC 24h	I	RC 24h
14	0.5xCIM	S	I	RC 24h	RC 24h	I	RC 24h
15	0.5xCIM	RC 24h	I	RC 24h	RC 24h	I	RC 24h
16	0.5xCIM	RC 24h	I	RC 24h	RC 24h	I	RC 24h
17	0.5xCIM	RC 24h	I	RC 24h	RC 24h	I	RC 24h
18	0.5xCIM	S	I	RC 24h	RC 24h	I	RC 24h
19	0.5xCIM	RC 24h	I	RC 24h	RC 24h	I	RC 24h
20	0.5xCIM	S	I	RC 24h	RC 24h	I	RC 24h
21	0.5xCIM	RC 24h	I	RC 24h	RC 24h	I	RC 24h
22	0.5xCIM	S	S	S	RC 24h	I	RC 24h
23	0.5xCIM	S	S	S	RC 24h	I	RC 24h
24	0.5xCIM	S	I	RC 24h	RC 24h	I	RC 24h
25	0.5xCIM	S	I	RC 24h	RC 24h	I	RC 24h
26	0.5xCIM	S	RC 24h	S	RC 24h	I	RC 24h
27	0.5xCIM	S	RC 24h	RC 24h	RC 24h	I	RC 24h
28	0.5xCIM	S	RC 24h	RC 24h	RC 24h	I	RC 24h
29	0.5xCIM	S	RC 24h	RC 24h	RC 24h	I	RC 24h
30	0.5xCIM	S	RC 24h	RC 24h	RC 24h	I	RC 24h

S: Combinação sinérgica; I: indiferente; RC24: recrescimento em 24 horas; []: concentração.

Foram construídas curva de morte onde é possível observar o efeito sinérgico ou indiferente de alguns isolados.

Figura 7- Cinética de crescimento bacteriano em função do tempo em horas para as diferentes combinações antimicrobianas avaliadas pelo método “*time-kill*”. A) colistina com meropenem (isolado 1), B) meropenem com amicacina (isolado 11), C) colistina com amicacina (isolado 9) e D) colistina com teicoplanina (isolado 29). FMUSP, São Paulo.

As características microbiológicas de todos os isolados do estudo apresentadas até o momento são sumarizadas na Tabela 9.

Tabela 9- Características microbiológicas: concentração inibitória mínima, presença de genes de resistência, genes de virulência e presença de sinergismo *in vitro* avaliadas em 30 isolados de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenêmicos. FMUSP, São Paulo.

Características microbiológicas	Total de isolados N=30 (%)
CIM Colistina	
Sensível	26 (87)
Intermediário	4 (13)
CIM Amicacina	
Sensível	10 (33)
Resistente	20 (67)
Genes de resistência	
bla _{SPM} somente	15 (50)
bla _{KPC} somente	0
bla _{SPM} + bla _{KPC}	6 (20)
Nenhum	9 (30)
Genes de virulência	
Todos	6 (20)
lasB	25 (83)
ToxA	28 (93)
ExoS	29 (97)
phzM	29 (97)
Sinergismo pelo Método do Tabuleiro	
Colistina x Meropenem	1 (3)
Colistina x Amicacina	0
Meropenem x Amicacina	9 (30)
Sinergismo pelo Método Time-kill	
Presente	20 (67)
Time – kill para cada combinação	
Colistina x Meropenem	17 (57)
Colistina x Amicacina	2 (7)
Meropenem x Amicacina	10 (33)

CIM: Concentração inibitória mínima

Após a descrição dos aspectos clínicos e microbiológico das infecções, foram realizadas análises da presença ou não de associação entre tais variáveis e o desfecho óbito em 14 dias, conforme **Tabela 10**.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos que evoluíram com sobrevida (N=6) ou óbito (N=19) quanto a características demográficas. Os grupos foram semelhantes quanto a características clínicas, exceto em relação ao tipo de fonte celular: dentre pacientes que evoluíram a óbito a proporção de pacientes submetidos à transplante alogênico foi maior quando comparada a pacientes que sobreviveram 14 dias após a infecção (79% versus 17% $p=0,012$).

Tabela 10- Dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais dos pacientes submetidos a transplante de célula-tronco hematopoética com infecção de corrente sanguínea por *P. aeruginosa* resistente a carbapenêmicos analisados quanto ao desfecho óbito em 14 dias. FMUSP, São Paulo.

Variáveis clínicas	Desfecho		Total (n=25)	p
	Vivo (n=6)	Óbito(n=19)		
Sexo Masculino	1 (17%)	7(37%)	8/25 (32%)	0,624
Idade (média $\pm$ dp)	55 (30-63)	46 (16-62)	48 (16-63)	0,075
Leucemia	0 (0%)	9(47%)	9/25 (36%)	0,057
Doença de base em remissão parcial ou progressão	4(67%)	15 (79%)	19/25 (76%)	0,606
Duração da hospitalização até a infecção (mediana, mín-max)	18 15-51)	19 (4-64)	19 (4-64)	0,975
Transplante alogênico	1 (17%)	15 (79%)	16/25 (64%)	0,012
Colonização prévia*	3 (50%)	4/17 (24%)	7/23 (30%)	0,318
Neutropenia na infecção	6(100%)	18 (95%)	24/25 (96%)	1,000
Presença de mucosite*	4 (67%)	12 (75%)	16/22 (73%)	1,000
Escore da gravidade de Pitt no dia da bacteremia (mediana; mín-max)	0 (0-0)	0 (0-12)	0 (0-12)	0,126
Pacientes com escore Pitt $\geq$ 4	0 (0%)	4(21%)	4/25 (16%)	0,540
Tempo entre TCTH e infecção (mediana, mín-max)	10 (6-12)	9 (0-87)	9 (0-87)	0,833
Tratamento adequado	3(50%)	13(68%)	16/25 (64%)	0,630
Tratamento empregado				
Três drogas	1(17%)	9(47%)	10/25 (40%)	0,345

* Dado ausente para 2 e 3 pacientes, respectivamente
TCTH: Transplante de células-tronco hematopoéticas

Não foi observada diferença no escore de gravidade de ICS entre os pacientes que sobreviveram e os que evoluíram para o óbito. No grupo que veio a falecer o tratamento com três antimicrobianos foi mais frequente (47% vs. 17%), sem significância estatística.

Tabela 11- Dados microbiológicos dos 30 isolados de *Pseudomonas aeruginosa* resistente à carbapenêmicos em infecções de corrente sanguínea de pacientes submetidos à transplante de células-tronco hematopoiéticas segundo o desfecho óbito. FMUSP. São Paulo.

Características microbiológicas	Desfecho		Total (n=25)	p
	Vivo (n=6)	Óbito (n=19)		
Resistência à amicacina	3 (50%)	16 (84%)	19 (76%)	0,125
Presença de qualquer gene de resistência testado (SPM ou KPC)	4 (67%)	14 (74%)	18 (72%)	1,000
Somente <i>bla_{SPM}</i>	4 (67%)	10 (53%)	14 (56%)	0,661
Concomitante <i>bla_{SPM}</i> e <i>bla_{KPC}</i>	0 (0%)	4 (21%)	4 (16%)	0,540
Presença ou não de TODOS os genes de virulência	3 (50%)	3 (16%)	6 (24%)	0,125
Gene <i>lasB</i>	3 (50%)	17 (90%)	20 (80%)	0,070
Gene <i>ExoS</i>	6 (100%)	18 (95%)	24 (96%)	1,000
Gene <i>phzM</i>	6 (100%)	18 (95%)	24 (96%)	1,000
Gene <i>ToxA</i>	6 (100%)	18 (95%)	24 (96%)	1,000
Presença de sinergismo pelo método do tabuleiro:				
Colistina e meropenem	1 (17%)	0 (0%)	1 (4%)	0,240
Colistina e amicacina	0 (0%; IC95% 0-0,46)	0 (0%; IC 95% 0-0,18)	0 (0%)	-
Meropenem e amicacina	3 (50%)	2 (11%)	5 (20%)	0,070
Presença de sinergismo pelo método "Time-kill"				
Colistina e meropenem	6 (100%)	9 (47%)	15 (60%)	0,051
Colistina e amicacina	2 (33%)	0 (0%)	2 (8%)	0,050
Meropenem e amicacina	3 (50%)	3 (16%)	6 (24%)	0,125

Os isolados de PARC em pacientes que sobreviveram e nos que vieram a falecer apresentavam resistência à AMK em proporção discretamente diferente (50% e 84%, p=0,125), sem significância estatística.

A mortalidade foi maior nos pacientes cujo isolado de PARC carregava o gene de virulência *lasB* (90% vs. 50% $p=0,070$), embora sem atingir significância estatística.

A presença de sinergismo por *time-kill* na combinação entre COL e MERO e entre COL e AMK mostraram tendência favorável a um melhor foi mais frequente nos isolados dos pacientes que sobreviveram, sem significância estatística.

Ao analisar a associação entre a presença ou não de efeito antimicrobiano sinérgico "*in vitro*" considerou-se somente os resultados dos ensaios realizados com a metodologia "*time-kill*".

Em pacientes cujo isolado bacteriano apresentou sinergismo houve menor proporção de tratamentos adequados (56% vs. 78%). A utilização de três drogas para o tratamento foi menor no grupo cujo isolado posteriormente mostrou presença de sinergismo (13% vs. 89% $p < 0,001$) (Tabela 12).

Tabela 12- Dados clínicos dos 25 pacientes transplantados com infecção de corrente sanguínea por *P. aeruginosa* analisados quanto a presença de sinergismo *in vitro* entre as diferentes combinações de antimicrobianos por meio do método de *time-kill*. FMUSP, São Paulo.

Variáveis	Presença de Sinergismo		Total (n=25)	p
	Não (n=9)	Sim (n=16)		
Previamente colonizado*	3 (33%)	4 (29%)	7 (30%)	1,000
Neutropenia < 500 cél/mm ³	9 (100%)	15 (94%)	24 (96%)	1,000
Escore da gravidade de Pitt (mediana; mín-max)	0 (0-0)	0 (0-12)	0 (0-12)	0,041
Tempo entre TCTH e infecção (mediana; mín-max)	9 (6-87)	9 (0-58)	9 (0-87)	0,531
Tratamento adequado	7 (78%)	9 (56%)	16 (64%)	0,401
Tratamento com 3 drogas	8 (89%)	2 (13%)	10 (40%)	<0,001
Resistência à amicacina	9 (100%)	10 (63%)	19 (76%)	0,057
Presença de qualquer gene de resistência	8 (89%)	10 (63%)	18 (72%)	0,355
Somente bla _{SPM}	7 (78%)	7 (44%)	14 (56%)	0,208
Concomitantemente bla _{SPM} e bla _{KPC}	1 (11%)	3 (19%)	4 (16%)	1,000
Presença de todos os genes de virulência	1 (11%)	5 (31%)	6 (24%)	0,364
Gene lasB	9 (100%)	11 (69%)	20 (80%)	0,123
Gene ExoS, phzM e toxA	8 (89%)	16 (100%)	24 (96%)	0,360

*Dado ausente para 2 pacientes

Não houve diferença entre as variáveis de interesse analisadas de acordo com a adequação ou não do tratamento empregado.

Ao comparar-se as diferentes características de acordo com o tipo de TCTH realizado, observa-se que pacientes mais jovens foram mais frequentemente submetidos à modalidade alogênico (mediana de idade de 37 anos no grupo alogênico vs. 55 anos no grupo autólogo, $p=0,002$). Pacientes transplantados alogênicos apresentaram de forma significativa uso mais frequente de três drogas na terapia anti-infecciosa (56% vs. 11%; $p=0,040$) (Tabela 13).

Tabela 13- Dados clínicos de pacientes submetidos a transplante de célula-tronco hematopoiética com infecção de corrente sanguínea por *P. aeruginosa* resistente a carbapenêmicos analisados quanto ao tipo de transplante. FMUSP, São Paulo.

Variáveis clínicas	Tipos de TCTH		Total (n=25)	p
	Autólogo (n=9)	Alogênico (n=16)		
Sexo Masculino	3 (33%)	5 (31%)	8 (32%)	1,000
Idade (mediana, mín-max)	55 (48-63)	37 (16-60)	48 (16-63)	0,002
Doença de base leucemia	0 (0%)	9 (56%)	9 (36%)	0,008
Doença de base em remissão parcial / progressão	6 (67%)	13 (81%)	19 (76%)	0,630
Duração da hospitalização (mediana; mín-max)	17 (15-19)	21 (4-64)	19 (4-64)	0,155
Colonização prévia*	3 (33%)	4 (29%)	7 (30%)	1,000
Neutropenia	8 (89%)	16 (100%)	24 (96%)	0,360
Presença de mucosite*	5 (56%)	11 (85%)	16 (73%)	0,178
Escore de gravidade de Pitt (mediana; mín-max)	0 (0-2)	0 (0-12)	0 (0-12)	0,227
Pacientes com escore Pitt ≥ 4	0 (0%)	4 (25%)	4 (16%)	0,260
Tempo entre a TCTH e infecção (mediana; mín-max)	9 (3-12)	10 (0-87)	9 (0-87)	0,378
Tratamento adequado	5 (56%)	11 (69%)	16 (64%)	0,671
Tratamento com 3 drogas	1 (11%)	9 (56%)	10 (40%)	0,040

* * Dado ausente para 2 e 3 pacientes, respectivamente

A maioria dos pacientes não era previamente colonizado por PARC e a pesquisa positiva não resultou em diferença no tempo decorrido entre a internação, ou entre o transplante e a ocorrência da ICS (Tabela 14).

Número discretamente maior de pacientes colonizados receberam terapia combinada com três drogas para o tratamento da infecção, do que os não-colonizados (57% vs. 31%), sem significância estatística.

Tabela 14- Dados clínicos de 23 pacientes transplantados com infecção de corrente sanguínea por *P. aeruginosa* que foram submetidos à pesquisa de colonização por este mesmo agente anteriormente à infecção. FMUSP, São Paulo.

Variáveis clínicas	Pesquisa de colonização		Total (n=23)	p
	negativa (n=16)	positiva (n=7)		
Sexo Masculino	3 (19%)	4 (57 %)	7 (30%)	0,137
Idade (mediana; mín-max)	52 (16-62)	48 (19-63)	51 (16-63)	0,462
Tempo de hospitalização até a infecção (mediana; mín-max)	19 (10-23)	19 (13-64)	19 (10-64)	0,347
Transplante alogênico	10 (63%)	4 (57%)	14 (61%)	1,000
Neutropenia	16 (100%)	6 (86%)	22 (96%)	0,304
Mucosite*	12 (80%)	3 (50%)	15 (71%)	0,291
Tempo entre TCTH e infecção (mediana; mín-max)	9 (0-58)	10 (3-87)	9 (0-87)	0,867
Tratamento adequado	10 (63%)	4 (57%)	14 (61%)	1,000
Tratamento com 3 drogas	5 (31%)	4 (57%)	9 (39%)	0,363

* Dado ausente para um paciente

4.9 Análise de sobrevida

Para melhor compreensão desse dado foram construídas curvas de sobrevida. Nota-se como descrito anteriormente uma tendência de diferença quanto a sobrevida ao comparar-se o tipo de transplante realizado (autólogo vs. alogênico), sem significância estatística e também uma tendência de maior

sobrevida em pacientes cujos isolados não possuíam o gene de virulência *lasb*

(Gráficos 2 e 3)

Gráfico 2- Curva de sobrevida de Kaplan Meier com avaliação do tipo de transplante de célula-tronco realizado e sobrevida intra-hospitalar de pacientes com infecção de corrente sanguínea por *P. aeruginosa* resistente a carbapenêmicos. FMUSP, São Paulo.

Log-rank
p= 0,092

Gráfico 8- Curva de sobrevivência de Kaplan Meier com avaliação da presença do gene de virulência *lasB* e sobrevivência intra-hospitalar de pacientes com infecção de corrente sanguínea por *P. aeruginosa* resistente a carbapenêmicos. FMUSP, São Paulo.

Log-rank
p= 0,152

5. Discussão

O aumento da incidência de bactérias MDR em serviços de saúde é inequívoco em todo o globo e sua prevenção e desenvolvimento de novos antimicrobianos tratados como prioridade pela Organização Mundial de Saúde¹³⁵. Unidades críticas como terapia intensiva e enfermarias de transplante concentram a maioria das infecções graves e ocorrência de surtos por estes agentes.

De acordo com a Agencia Nacional de Vigilância Sanitária brasileira, no ano de 2015, 39% dos isolados de *P. aeruginosa* de ICS nas unidades de terapia intensiva nacionais eram resistentes à carbapenêmicos .

A unidade de transplante de medula óssea apresenta a particularidade de unir doentes profundamente imunodeprimidos, com intenso uso de dispositivos invasivos e exposição à antibioticoterapia, profilática ou para o tratamento de neutropenia febril. É cenário propício para o desenvolvimento de infecções graves, como a própria ICS.

Em nossa unidade de TCTH desde o início dos anos 2000 a *P. aeruginosa* é o principal agente de ICS e o surto causado por isolados resistente a carbapenêmicos exigiu um estudo aprofundado das características microbiológicas e a presente busca por alternativas terapêuticas^{22,136}.

Concordante com relatos anteriores, também na presente casuística pacientes submetidos à transplante alogênico foram mais acometidos por episódios de ICS^{15,17}. Optou-se por não discriminar o tipo de doador (aparentado e não-aparentado), dado o pequeno número de casos. Trata-se de uma subpopulação com período prolongado de neutropenia e maior incidência de mucosite, corroborando para maiores taxas de infecção.

Recentemente o dado sobre mucosite, presente na ampla maioria dos pacientes estudados, passou a ser um componente da vigilância e notificação de infecções das unidades de transplante e oncologia. Criou-se a definição de “infecção associada a injúria da barreira mucosa”, para diferenciar ICS cuja fonte não eram classicamente o cateter e sim translocação e, dessa forma, modificar o foco das medidas preventivas¹³. O presente trabalho foi iniciado em período anterior a tal definição e por sua natureza retrospectiva houve perda da informação em uma parcela dos casos.

Analizou-se também a aplicação de um escore de gravidade, o escore de bacteremia desenvolvido e validado pela Universidade de Pittsburg e reproduzido posteriormente¹¹⁷. É um escore mais simples e factível a “beira-leito” do que os clássicos *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation* (APACHE) e *Sequential Organ Failure Assessment* (SOFA). Nesta casuística, a despeito da elevada mortalidade, o escore de Pitt foi baixo. Somente 14% dos pacientes apresentaram escore ≥ 4 , performance muito diferente da literatura para doentes em terapia intensiva e de séries de casos, o que pode traduzir uma limitação em prever gravidade em neutropênicos.

Embora cada vez mais utilizado, inclusive em estudos recentes para avaliação de terapia combinada em ICS por Enterobactérias resistentes à carbapenêmicos como o INCREMENT¹³⁷ e série de casos de pacientes com ICS por PARC¹³⁸, publicações utilizando esse escore ainda são raras na população de pacientes neutropênicos e costumam relacionar escores elevados com mortalidade mais tardia do que a avaliada na presente casuística^{139,140}.

A maioria dos pacientes com ICS não era previamente colonizada. A vigilância sistemática semanal por meio de cultura de *swab* retal (ou fezes nos neutropênicos) teve início após os primeiros casos, com apenas três pacientes sem esta informação. A baixa proporção encontrada, no entanto, deve não só refletir uma possível transmissão cruzada em pacientes não colonizados, como também significar uma baixa sensibilidade do método laboratorial de detecção¹⁴¹. Cabe lembrar ainda que não há no momento kit comercial para detecção de genes de resistência por PCR em *P. aeruginosa*.

A vigilância de colonização vem sendo cada vez mais empregada nas unidades de transplante, com prevalência de colonizados por bactérias MDR ao redor de 40% e importante associação com a ocorrência de infecção, especialmente ICS, pelo mesmo agente^{23,142}. Já a análise do impacto da colonização na sobrevida global do paciente traz resultados discordantes¹⁴³.

A mortalidade geral da população do estudo em 14 dias foi elevada (68%) e precoce, dados muito semelhantes aos reportados por Mikulska e colaboradores, na Itália²⁴, e muito superior à mortalidade em 14 dias reportada em pacientes submetidos à transplante de órgão sólido, de 19%¹³⁸.

Dentre os pacientes efetivamente tratados, ou seja, que receberam colistina por pelo menos um dia, somente 68% receberam a medicação nas primeiras 24 horas após a coleta da hemocultura positiva. Diversos autores mostram o quão crucial é o início do tratamento apropriado e precoce, idealmente na primeira hora após a febre em pacientes neutropênicos¹⁴⁴. O atraso na administração resulta em maior mortalidade, já que o início empírico de drogas tóxicas como colistina e/ou aminoglicosídeos deve ser evitado, o que

infelizmente só seria possível se método rápido, por PCR, de identificação da presença dos determinantes de resistência fossem disponíveis.

A maioria das ICS (80%) ocorreu até 12 dias após a infusão das células precursoras. Trata-se de ICS no período mais crítico do transplante, com grande número de neutropênicos (somente dois pacientes não o estavam).

A análise microbiológica mostrou que as CIMs eram muito elevadas para o carbapenêmico testado, meropenem, com CIM50 e CIM90 muito acima do descrito anteriormente em espécimes clínicos no nosso meio¹⁴⁵ ou em estudos de vigilância de sensibilidade aos antimicrobianos, como no trabalho que reporta na América Latina CIM90 do meropenem para *P. aeruginosa* >8 ug/ml¹⁴⁶. De forma interessante, no entanto, no estudo da presença de genes de resistência em PARC da microbiota de aves migratórias da cidade de São Paulo, CIMs mais elevadas (>256) foram descritas¹⁴⁷.

Tal valor elevado da CIM em nossos isolados, poderia corroborar para uma futilidade no emprego dessa classe de antimicrobianos no tratamento, uma vez que os estudos com Enterobactérias resistentes à carbapenêmicos, até o momento, preconizam o uso desta classe contra patógenos resistentes somente se CIMs mais baixas ($\leq$ 8ug/ml), utilizando-se doses maiores e infusão prolongada¹³⁷, como já realizado de forma rotineira no nosso protocolo institucional de tratamento¹¹⁸.

Todavia, além do potencial benefício da combinação, outra preocupação de manter o carbapenêmico no tratamento é a resistência intrínseca à polimixina de alguns gêneros bacterianos também importantes no paciente neutropênico hospitalizado, tais como *Proteus* e *Serratia* em particular

durante o uso de polimixinas. A experiência é limitada com essa droga em monoterapia na população hematológica, embora com alguns relatos de segurança e baixa incidência de toxicidade neurológica e renal¹⁴⁸.

O aumento da CIM para colistina nos quatro isolados mais recentes exige cautela, dado o aumento da resistência à colistina em todo o mundo e em diferentes gêneros bacterianos^{149,150}.

Em cerca de 80% dos isolados foi possível a detecção de genes associados a produção de metalo- β -lactamases. A carbapenamase mais frequentemente identificada foi *bla*_{SPM}, no entanto seis abrigaram ambas: *bla*_{KPC} e *bla*_{SPM}⁷⁷. Foi na Colômbia que se reportou pela primeira vez a presença de *bla*_{KPC} em isolados de *P. aeruginosa*¹⁵¹. No Brasil a primeira descrição foi realizada por pesquisadores de Recife¹⁵².

A produção de SPM-1, São Paulo metalo- β -lactamase, tem sido o mecanismo mais comum de resistência aos carbapenêmicos identificado em *P. aeruginosa* nos hospitais brasileiros^{153,154} e, diferente das demais carbapenemases como NDM, IMP e KPC, relatada apenas em *P. aeruginosa*.

Isso reduz a esperança de melhores resultados com o advento de novas drogas potentes contra *P. aeruginosa*, porém sem ação contra carbapenamases, como o ceftalozone-tazobactam¹⁵⁵.

Dessa forma, nossas atenções voltaram-se para os resultados do sinergismo *in vitro* de drogas já disponíveis e empregadas no tratamento da população do estudo. Inclusive cogitou-se uma ação da droga classicamente utilizada para cobertura de bactérias Gram-positivas durante o manejo de neutropenia febril no nosso centro, a teicoplanina, baseado em resultados

positivos com vancomicina e rifampicina ⁹⁹, o que não ocorreu em nossos experimentos.

Embora mais prática e factível para decisões clínicas rápidas, o método de avaliação do sinergismo *in vitro* chamado “do tabuleiro” ou *checkerboard* vem sendo suplantado na literatura médica por sua baixa performance e informação limitada. Em nossos experimentos não foi diferente.

Já na avaliação por *time kill*, apesar de altamente resistentes ao MERO, em metade dos isolados ocorreu sinergismo *in vitro* na combinação de MERO com COL e o grupo que recebeu essa combinação mostrou tendência para menor mortalidade. Somente os isolados já sensíveis a amicacina apresentaram efeito sinérgico na combinação entre MERO e amicacina.

Zusman e colaboradores encontraram resultados semelhantes em uma meta-análise com 15 estudos: a combinação *in vitro* de um carbapenêmico com uma polimixina (E ou B) foi sinérgica em 59% dos 43 isolados de PARC testados. No entanto, diferentes carbapenêmicos (imipenem, meropenem e doripenem) foram utilizados ¹⁵⁶.

O emprego de terapia combinada é tentador, uma vez que aumenta a probabilidade de sucesso na terapia inicial, já mencionada como crucial. Hu e colaboradores avaliaram especificamente a combinação de antimicrobianos para o tratamento de ICS por *P. aeruginosa*. Os autores incluíram dez estudos clínicos mas não houve diferença em mortalidade por meta-análise ¹⁵⁷.

Até o momento, os melhores resultados experimentais ocorreram com o uso do doripenem como parte do teste *in vitro*, mas a experiência clínica com essa medicação na população submetida a TCTH é pequena ¹⁵⁸. Além de não estar disponível no Brasil, são poucos os dados com doripenem em pacientes

transplantados nos quais as particularidades como interações farmacológicas não devem ser minimizadas ^{157,159}.

Em contraste com estudos anteriores ¹⁶⁰, a combinação com a amicacina não foi sinérgica. Não incluímos o antimicrobiano Aztreonam pela indisponibilidade da droga para uso clínico em nosso meio.

Infelizmente os dados levantados não permitem conclusões quanto a superioridade ou não da terapia combinada, ainda uma lacuna no conhecimento científico.

Há pouco foi publicado ensaio clínico randomizado, aberto e multicêntrico cujo objetivo foi comparar o uso de COL em monoterapia versus COL em associação com MERO, para o tratamento de infecções graves por BGN resistentes a carbapenêmicos e que não encontrou benefício na combinação ¹⁶¹. Tal conclusão, porém, só é válida para infecções causadas por *A. baumannii*, uma vez que a amostra de pacientes com infecção por PARC também foi muito pequena (n=12).

No momento está em andamento outro ensaio clínico randomizado com o mesmo objetivo e espera-se que tenha poder estatístico suficiente para responder tal questionamento (NCT01597973, ClinicalTrials.gov).

A despeito da premissa de que micro-organismos com maior desenvolvimento de mecanismos de resistência perderiam fatores de virulência, os isolados da nossa casuística apresentaram, contrariamente, todos os determinantes de virulência estudados por meio de PCR específica.

Peña e colaboradores mostraram associação entre a expressão do gene *ExoU* e a mortalidade em 590 pacientes com ICS por *P. aeruginosa*,

ainda que o gene tenha sido encontrado mais frequentemente em bactérias sensíveis ¹⁰⁷. O gene *ExoU* não foi identificado em nossos clones, provavelmente porque eles são resistentes a múltiplos fármacos.

A existência de elevado número de determinantes de virulência bacteriana em nossos isolados deve relacionar-se a gravidade dos casos, somada provavelmente a fatores genéticos do hospedeiro ¹⁶², culminando para uma mortalidade maior do que a reportada em ICS causadas por outras espécies igualmente resistentes ¹⁶³.

Em nosso estudo, pacientes com ICS em cujo isolado de PARC o gene *lasB* foi detectado, evoluíram com maior frequência para o óbito. Este fator de virulência está associado à produção da enzima bacteriana denominada *elastase*, que degrada imunoglobulina e complemento ¹¹⁰.

Uma antiga estratégia, a administração de imunoglobulina para tratamento de infecções virais após o TCTH, poderia ser estudada neste cenário. Pelo menos um estudo com modelo de camundongos imunodeprimidos com pneumonia por *P. aeruginosa* mostrou que a imunoglobulina intravenosa (IVIG) restaurou parcialmente o sistema imune ¹⁶⁴. Rossman e colaboradores encontraram efeito opsonizante e anticorpos protetores em preparações de IVIG humana contra alvos presentes em BGN resistentes ¹⁶⁵.

Embora estudos com a reposição específica de IgM na população pediátrica submetida à TCTH não tenham reduzido episódios febris ou infecciosos, a presença de tais mecanismos de virulência bacteriana e seu eventual uso como alvo terapêutico merecem ser melhor compreendidos ¹⁶⁶.

O estudo da clonalidade por meio de técnicas moleculares como PFGE ou MLST facilitam a compreensão das rotas de transmissão de infecções relacionadas a assistência à saúde ¹⁶⁷.

A determinação de cinco diferentes clones no período de estudo, com um clone predominante responsável por pouco mais da metade dos casos e presente ao longo dos três anos avaliados, reforça a necessidade de uma abordagem múltipla na prevenção da ocorrência destas infecções, com vistas desde a redução da transmissão cruzada, quanto com o uso de estratégias individuais como menor exposição à antimicrobianos de amplo espectro e descolonização.

Tendo em vista os recursos limitados para a realização do sequenciamento do genoma total bacteriano, somente oito isolados puderam ser melhor caracterizados, com somente um clone (clone E) não representado.

Além dos genes de virulência pesquisados por reação de cadeia de polimerase, o sequenciamento mostrou que os clones abrigaram um grande número de fatores de virulência como *ExoS* e *ExoY*, genes associados com o *quorum-sensing*, formação de biofilme e os genes de operons de fenazina, responsáveis pelo aumento do estresse oxidativo intracelular ¹¹⁰.

Todos os clones pertenciam ao ST277 que é amplamente difundido no território brasileiro, descrito em vários surtos no país ^{76,168} e inclusive relatado recentemente no Reino Unido em um paciente que foi submetido a cirurgia durante a viagem ao Brasil ¹⁶⁹.

Os isolados apresentavam ainda outros determinantes de resistência na análise do sequenciamento genômico: o gene *rmtD1* que confere resistência de alto nível a todos os aminoglicosídeos e foi associado ao ST277,

estava presente em alguns clones. Outro achado importante foi que todos os clones carregavam o transposón 4371, com o alerta para o potencial de disseminação desta linhagem no mundo, uma vez que o gene *bla*_{SPM} estava localizado no próprio Tn4371 ¹⁷⁰.

O sequenciamento do genoma também permitiu o estudo de mutações que alteram as propriedades da membrana externa bacteriana, tais como F170L, T103S e K115T na proteína OprD, também descritas por Estepa e colaboradores ¹⁷¹. Em todos os isolados sequenciados foram identificadas as mesmas mutações em porinas e em partes das bombas de efluxo presentes nas cepas: MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexGHI-OpmD. As mutações também eram presentes no ativador pós-transcrição da bomba de efluxo MexEF-OprN e nas proteínas de ligação à penicilina PBP1a, PBP1b, PBP4.

O alto número de polimorfismos observados nos genes das proteínas da membrana externa podem estar diretamente relacionados a resistência aos carbapenêmicos, em especial às elevadas CIM de meropenem ¹⁷².

Apesar da alta mortalidade, o ST 277 difere dos ST internacionais descritos em *P. aeruginosa* em vários hospitais em todo o mundo, como ST235, ST111 e ST175 ^{71,173,174}.

O gene de virulência *ExoU*, que é associado a maior mortalidade em ICS por *P. aeruginosa* não foi identificado em nossos clones, achado semelhante ao descrito em estudo recente com as linhagens ST111, ST175 e ST235 ¹⁷⁰.

Existem poucos estudos de sinergismo *in vitro* em bactérias MDR isoladas em uma população de pacientes tão homogênea. Apesar da grande

casuística ao comparar-se com os números de casos previamente publicados, a amostra de pacientes foi pequena e não foi estatisticamente possível qualquer conclusão sobre o benefício de usar a terapia combinada, bem como outras associações em análise multivariada.

A natureza retrospectiva foi outra importante limitação do nosso estudo. Não foi possível, por exemplo, mensurar o dado controle de foco, pois muitos prontuários não apresentavam a informação quanto à retirada do CVC e o momento em que isto ocorreu. Cinco pacientes que morreram antes de receber colistina ou em quem o TCTH foi adiado foram excluídos, mas não acreditamos que isso tenha impactado nos resultados.

6. Conclusões

Pacientes submetidos a TCTH alogênico e neutropênicos predominaram entre os acometidos por ICS por *P. aeruginosa* resistente a carbapenêmicos, com elevada mortalidade.

A maioria dos isolados de PARC apresentaram valores elevados de CIM para meropenem e sinergismo *in vitro* para a combinação entre meropenem e colistina. A presença deste efeito foi mais freqüente nos pacientes que sobreviveram.

O gene de carbapenamase mais frequente foi *bla*_{SPM} e 6 isolados apresentaram *bla*_{SPM} e *bla*_{KPC}. A maioria dos isolados tinha todos os genes relacionados com virulência pesquisados, caracterizando isolados com elevada resistência e virulência.

Foram identificados 5 clones por PFGE. O sequenciamento do genoma total mostrou que os clones carregavam SPM-1, Tn4371, mutações associadas com alterações na membrana externa bacteriana e pertenciam ao ST277.

7. Anexos

Anexo A- Protocolo institucional para coleta de hemoculturas

[Home](#) [Manual de Exames](#) [Institucional](#) [Área Restrita](#) [Contato](#)

CULTURA AERÓBIA DE SANGUE

Restrição operacional

- Não

Sinônimas

- HEMOCULTURA
- HEMOCULTURA AEROBIA

Exames Correlacionados

- CULTURA AERÓBIA DE PONTA DE CATETER DE DERIVAÇÃO VENTRICULAR (DVE OU DVP)
- CULTURA AERÓBIA SEMIQUANTITATIVA DE PONTA DE CATETER INTRAVASCULAR
- CULTURA ANAERÓBIA DE SANGUE
- CULTURA PARA FUNGOS DE PONTA DE CATETER INTRAVASCULAR
- CULTURA PARA FUNGOS DE SANGUE

Indicações

- Estabelecer ou afastar diagnóstico de infecção por corrente sanguínea primária ou secundária por agente infeccioso (bacteriano ou leveduras).

Orientações e Preparo do Paciente

- Não se aplica.

Material de coleta e Recipiente

- Frascos de hemocultura: Aeróbio, Anaeróbio e Pediátrico.
- Luvas de procedimento, garrote
- Álcool etílico a 70%, clorexidina alcoólica 0,5% e gaze estéril
- Seringa e agulha

Instruções de coleta

- 1 par de hemocultura = 2 frascos de hemocultura do mesmo sítio (1 frasco aeróbio e 1 frasco anaeróbio).
- Coleta ideal: antes do início da antibioticoterapia (se já iniciado, antes da próxima dose de antibiótico) e no momento subfebril.
- Sangue venoso possui equivalência diagnóstica ao sangue arterial.
- Volume específico por frasco:
 - aeróbio: 8 a 10 mL
 - pediátrico: 1 a 3 mL
- Volume recomendado:
 - ADULTOS: recomendado de 2 pares a até 3 pares de hemocultura em sítios diferentes, simultaneamente ou consecutivos, de acordo com tipo de bacteremia) distribuídos nos frascos de hemocultura, sempre respeitando o volume máximo de cada frasco.
 - CRIANÇAS: os volumes recomendados são:

- * Neonatos até 1 ano: 0,5 a 1,5 mL, preferencialmente > 1 mL.
- * Crianças acima de 1 ano: 1 mL por idade, e se maior que 3 anos, dividir o volume em dois frascos de hemoculturas, respeitando o volume máximo de cada frasco (por exemplo: 3 anos de idade, coletar um total de 3 mL de sangue e infundir em 1 frasco; 6 anos: coletar 6 mL e distribuir 3 mL em cada frasco Pediátrico).
- * Acima de 8 mL, utilizar Frasco Aeróbio (8 a 10 mL).

Adequar a coleta à fisiopatologia da situação clínica:

- Para sepse ou bacteremia de origem indeterminada: obter 2 ou 3 pares de hemoculturas, volume máximo, consecutivamente de locais diferentes.
- Para suspeita de endocardite e febre de origem indeterminada: colher de 2 a 3 frascos com intervalos de 20 a 30 minutos, volume máximo permitido nos frascos.

OBSERVAÇÃO: se a coleta de hemocultura já tiver sido realizada duas vezes em situação ideal, a coleta de múltiplas amostras deve ser desencorajada se o quadro clínico não se alterar.

COLETA:

- Higienizar as mãos.
- Colocar as luvas de procedimento.
- Aplicar álcool 70% na borracha do frasco de coleta de hemocultura antes de inocular o sangue.
- Garrotear o membro do paciente e localizar a veia.
- Fazer antisepsia do local a ser puncionado em movimento circular do centro para a periferia utilizando algodão com álcool etílico a 70%, deixar secar por 30 segundos, e posteriormente com clorexidina alcoólica 0,5% e deixar secar por 60 segundos. Não palpar sítio da punção após o procedimento.
- Não é necessário trocar de agulha para inoculação dos frascos.
- Sempre inocular primeiro o sangue no frasco aeróbio.
- Misturar o conteúdo dos frascos por inversão.

Amostras Inaceitáveis:

- Frascos de hemocultura sem identificação, com identificação incorreta, trincados/quebrados ou extravasados.

Transporte e Conservação Pré-analítica

- Preferencialmente imediato.
- Até 12h, a temperatura ambiente.

Metodologia

- Semeadura em meios Bactec - automatizado e identificação manual/Vitek/Maldi Tof.

Interpretação Clínica

• Positiva:

- provável correlação com processo infeccioso.
- Correlacionar o resultado obtido de outras hemoculturas.
- Crescimento de *Staphylococcus* coagulase negativo, *Corynebacterium* spp., *Bacillus* spp., *Propionibacterium acnes* em apenas uma hemocultura, considerar a possibilidade de contaminação.

• Negativa:

- cultura negativa não exclui possibilidade de infecção.
- A sensibilidade do método é variável de acordo com o sítio de infecção, coleta inadequada, coleta em vigência de antimicrobiano. Levar em consideração dados clínicos.

Valores de Referência

- Negativa

Prazo Máximo de Liberação

- negativo: 5 dias • positivo: até 10 dias

Seção Executante

DLC - Microbiologia

Disponibilidade

- 24 h

Referências Bibliográficas

- . Isenberg, Henry D. Clinical Microbiology Procedures Handbook. ASM, 2007
- . Miller, J. Michael - A Guide to Specimen Management in Clinical Microbiology, 2nd Edition. ASM, 1999
- . Versalovic, James et al - Manual of Clinical Microbiology, Tenth Edition. 2011.

Exame aprovado em 20/03/2018 | Versão: 16
Aprovador(es): Thais Sabato Romano Di Gioia
Elaborador(es): Adriana Lopes Motta

Anexo B- Protocolo institucional para coleta de cultura de vigilância

VIGILÂNCIA DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA CARBAPENEM RESISTENTE

Restrição operacional

- Após às 16h somente com autorização do Laboratório de Microbiologia.
- Exame realizado somente com autorização do SCIH da Instituição (deve conter carimbo do SCIH), reservado para controle de surto.

Sinônimos

- PESQUISA DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA RESISTENTE A CARBAPEM RESISTENTE DE COLOSTOMIA
- PESQUISA DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA RESISTENTE A CARBAPEM RESISTENTE DE FEZES
- PESQUISA DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA RESISTENTE A CARBAPEM RESISTENTE DE OROFARINGE
- PESQUISA DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA RESISTENTE A CARBAPEM RESISTENTE DE OUTROS
- PESQUISA DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA RESISTENTE A CARBAPEM RESISTENTE DE SECREÇÃO TRAQUEAL
- PESQUISA DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA RESISTENTE A CARBAPEM RESISTENTE DE SWAB
- PESQUISA DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA RESISTENTE A CARBAPEM RESISTENTE DE SWAB AXILAR/VIRILHA/PERÍNEO
- PESQUISA DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA RESISTENTE A CARBAPEM RESISTENTE DE SWAB RETAL

Exames Correlacionados

Indicações

- Pesquisar colonização de Pseudomonas aeruginosa carbapenem resistente no paciente.

Orientações e Preparo do Paciente

- Não se aplica

Material de coleta e Recipiente

- Swab estéril em meios de transporte Stuart.
- Se outros materiais clínicos, frasco estéril.

Instruções de coleta

- Coletar conforme Manual da SCIH.
- OBS: sinalizar no pedido se cultura de vigilância também de materiais clínicos: urina de pacientes sondados, secreção traqueal de pacientes em ventilação mecânica ou ainda swab de lesões de pele.

Transporte e Conservação Pré-analítica

- Swab:
- Preferencialmente imediato.
 - Meio de transporte (Stuart), até 6h, a TA.

Urina sonda vesical de demora:

- Preferencialmente imediato.
- Até 2h, a temperatura ambiente.
- Se tempo de transporte > 2h, preservar amostra sob refrigeração (2 a 8° C) por até 12h.

Secreção traqueal:

- Preferencialmente imediato.
- Até 2h, a temperatura ambiente.
- Superior 2h sob refrigeração (2 a 8° C) por até 12h

Fezes:

- Preferencialmente imediato.
- Até 12h sob refrigeração (2 a 8 °C) .

Fragmentos:

- Preferencialmente imediato.
- Até 6 h, com meio de transporte (caldo tioglicolato), a TA.
- Até 1h, tubo com solução fisiológica esteril, a TA.

Metodologia

- Semeadura em meios de cultura específicos e identificação manual/Vitek/Maldi ToF

Interpretação Clínica

- **Positiva:** paciente colonizado.
- **Negativa:** amostra negativa para o agente pesquisado.

Valores de Referência

- Negativa

Prazo Máximo de Liberação

- Negativa: 4 dias • Positiva: até 10 dias

Seção Executante

DLC - Microbiologia

Disponibilidade

- O material deve chegar ao laboratório antes das 16:00h, durante dia útil.
- Os exames só serão realizados após aprovação (carimbo) da SCIH.
- Para solicitações de cultura de vigilância em grande quantidade, fora do usual da rotina, em casos de investigação de surtos, é necessário antes entrar em contato com a microbiologia para autorização prévia, via email: microbiologia.dlc@hc.fm.usp.br

Referências Bibliográficas

- Isenberg, Henry D. Clinical Microbiology Procedures Handbook. ASM, 2007
- Miller, J. Michael - A Guide to Specimen Management in Clinical Microbiology, 2nd Edition. ASM, 1999
- Versalovic, James et al - Manual of Clinical Microbiology, Tenth Edition. 2011.

Exame aprovado em 19/07/2017 | Versão: 14
Aprovador(es): Valeria Teixeira Alves Rosa
Elaborador(es): Adriana Lopes Motta

← voltar

Anexo C- Aprovação no Comitê de ética em pesquisa

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

Título: AVALIAÇÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA E SINERGISMO IN VITRO DE ISOLADOS DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA RESISTENTE A CARBAPENÊMICOS EM UNIDADE DE TRANSPLANTE DE CÉLULA TRONCO HEMATOPOIÉTICA

Pesquisador Responsável: Sílvia Figueiredo Costa

Versão: 1

Pesquisador Executante: Jéssica Fernandes Ramos

CAAE: 35008313.2.0000.0068

Co-autores: Camila Rizek, Gleice Cristina Leitenneke Marie van der HeijdenThaís

GuimarãesLucas Chaves NetoAnna Sara LevinMaria Aparecida Shikanai-Yasuda

Finalidade Acadêmica: Doutorado

Orientador: Dra Sílvia Figueiredo Costa

Instituição: HCFMUSP

Departamento: MOLÉSTIAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 11518

Número do Parecer: 795.236

Data da Relatoria: 17/09/2014

Apresentação do Projeto: Os autores pretendem avaliar se há sinergismo entre antibióticos contra isolados de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenêmicos (PaRC), isoladas em sangue de pacientes submetidos a transplante de célula tronco hematopoiética (TCTH), bem como determinar a presença de genes codificadores de fatores de virulência e a existência de correlação entre esses achados e a evolução clínica dos pacientes. Para a avaliação da presença de sinergismo utilizarão a técnica do tabuleiro ou checkerboard e esclarecem ser esta a principal técnica laboratorial usada atualmente, baseada em concentrações fixas de antimicrobianos. O nome do método se deve ao aspecto formado na placa por diferentes diluições dos dois antibióticos em teste, em concentrações iguais, acima, e abaixo das suas concentrações inibitórias mínimas (CIMs) contra os microorganismos que são testados e frequentemente avaliados pela concentração inibitória fracional (CIF), uma reformulação matemática do isoblograma. Neste método, o CIF para cada fármaco é obtido pela divisão da concentração da droga necessária para inibir o crescimento da bactéria em sua linha de teste pela CIM da bactéria em teste para a droga sozinha. Mesmo quando existe resistência aos antibióticos individualmente, se a atividade de dois antimicrobianos em conjunto é superior à atividade de cada um individualmente, diz-se que o resultado do sinergismo é positivo, pois ocorreu aumento de potência microbiológica com a combinação. Da mesma forma pode-se definir antagonismo como o prejuízo à atividade dos antimicrobianos e indiferença quando a adição de antimicrobianos não altera o desempenho das drogas isoladamente (Rybak, 1996). Até o presente momento, não existe recomendação do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ou do European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) quanto a melhor metodologia a ser empregada. Serão avaliados, in vitro, quanto a presença de sinergismo, 30 isolados de PaCR cedidas pelo Laboratório de Microbiologia do Instituto Central do Hospital das Clínicas ao banco de cepas do LIM54. Todas as amostras foram isoladas em hemoculturas de pacientes da unidade de Transplante de Medula Óssea do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) no período de dezembro de 2011 a dezembro de 2012. Dentre estas cepas, três representantes de cada clone serão selecionadas aleatoriamente para a avaliação da presença de fatores de virulência. Também serão utilizadas nesta etapa isolados do banco de cepas do LIM54: duas isoladas durante um surto de 2009 e uma isolada em um surto de 2007. As amostras serão cultivadas em meio seletivo (MacConkey) e reidentificadas no laboratório de bacteriologia do Instituto de Medicina Tropical. O antimicrobiano colistina será testado

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar

CEP 05403-010 - São Paulo - SP.

55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | Cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

em combinação com as respectivas drogas: amicacina, gentamicina, meropenem, fosfomicina, vancomicina e teicoplanina, a fim de avaliar o efeito sinérgico dos mesmos. Serão revisados os prontuários dos pacientes que apresentaram infecção de corrente sanguínea por PaCR. Tamanho da Amostra no Brasil: 30. O Estudo será realizado apenas no HCFMUSP.

Objetivo da Pesquisa: Objetivo primário: avaliar o efeito sinérgico in vitro de antimicrobianos contra isolados de corrente sanguínea de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenêmicos (PaCR). Objetivo secundário: avaliar a correlação clínica entre o uso de terapia combinada pelos pacientes com infecção de corrente sanguínea e a presença ou não de sinergismo in vitro; determinar os mecanismos de resistência aos carbapenêmicos dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* e a clonalidade dos mesmos; determinar os fatores de virulência nos diferentes clones de PaCR na unidade de TCTH.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Não há riscos. Benefícios - potencialmente, melhorar a eficácia de esquemas de antibioticoterapia usados para tratar pacientes com alto risco de desenvolver infecções muito graves.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: O tema é relevante, pois além de ser a *Pseudomonas aeruginosa* é um dos principais agentes de infecção hospitalar em pacientes transplantados, apresenta múltiplos mecanismos de resistência e é de difícil tratamento. A presença de efeito sinérgico de antimicrobianos pode ser útil para o tratamento contra esse agente. Os Pesquisadores se dedicam rotineiramente ao controle de infecções hospitalares e têm boas condições de infraestrutura para a realização do trabalho.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Os autores solicitam dispensa de TCLE e este pode, de fato, ser dispensado, dado que haverá apenas revisão de prontuários.

Recomendações: Nenhuma

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Sem pendências.

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP: Não

Considerações Finais a critério do CEP: : Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: **a)** desenvolver o projeto conforme delineado; **b)** elaborar e apresentar relatórios parciais e final; **c)** apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; **d)** manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; **e)** encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; **f)** justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

São Paulo, 17 de Setembro de 2014

Prof. Dr. Alfredo José Mansur
Coordenador

Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

8. Referências Bibliográficas

1. Singh AK, McGuirk JP. Allogeneic stem cell transplantation: A historical and scientific overview. *Cancer Res.* 2016;76(22):6445–51.
2. Hashmi SK. Basics of Hematopoietic Cell Transplantation for Primary Care Physicians and Internists. *Prim Care - Clin Off Pract [Internet]*. 2016;43(4):693–701. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pop.2016.07.003>
3. Transplantes, Associação Brasileira (ABTO). *Revista Brasileira de Transplantes* (2010-2017). 2017.
4. Wingard JR, Hsu J, Hiemenz JW. Hematopoietic Stem Cell Transplantation: An Overview of Infection Risks and Epidemiology. *Infect Dis Clin North Am [Internet]*. 2010 Jun [cited 2018 Mar 20];24(2):257–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20466269>
5. de Naurois J, Novitzky-Basso I, Gill MJ, Marti FM, Cullen MH, Roila F. Management of febrile neutropenia: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol [Internet]*. 2010 May 1 [cited 2018 Mar 20];21(Supplement 5):v252–6. Available from: <https://academic.oup.com/annonc/article-lookup/doi/10.1093/annonc/mdq196>
6. Ogonek J, Juric MK, Ghimire S, Varanasi PR, Holler E, Greinix H, et al. Immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Front Immunol.* 2016;7(NOV):1–15.
7. de Castro CG, Gregianin LJ, Brunetto AL. [Bone marrow transplantation and cord blood transplantation in children]. *J Pediatr (Rio J) [Internet]*. [cited 2018 Mar 20];77(5):345–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14647838>
8. Anasetti C, Logan BR, Lee SJ, Waller EK, Weisdorf DJ, Wingard JR, et al. Peripheral-blood stem cells versus bone marrow from unrelated donors. *N Engl J Med [Internet]*. 2012 Oct 18 [cited 2018 Mar 20];367(16):1487–96. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa1203517>
9. Dykewicz CA, Centers for Disease Control and Prevention (U.S.), Infectious Diseases Society of America, American Society of Blood and Marrow Transplantation. Summary of the Guidelines for Preventing Opportunistic Infections among Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *Clin Infect Dis.* 2001 Jul 15; 33 (2): 139–44. doi/10.1086/321805
10. Young J-AH, Logan BR, Wu J, Wingard JR, Weisdorf DJ, Mudrick C, et al. Infections after Transplantation of Bone Marrow or Peripheral Blood Stem Cells from Unrelated Donors. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2016 Feb; 22(2):359–70.
11. Tomblyn M, Chiller T, Einsele H, Gress R, Sepkowitz K, Storek J, et al. Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplantation recipients: a global perspective. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009 Oct;15(10):1143–238.
12. Horan TC, 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 Jun; 36(5):309–32.
13. Infections C. CDC/NHSH Bloodstream Infection Event (Central Line-Associated Bloodstream Infection and Non-central line-associated Bloodstream Infection). Centers Dis Control Prev Natl Healthc Saf Network. 2015;(January):www.cdc.gov/nhsn/PDFs/pscManual/4PSC_CLABScurrent.
 14. Piñana JL, Montesinos P, Martino R, Vazquez L, Rovira M, López J, et al. Incidence, risk factors, and outcome of bacteremia following autologous hematopoietic stem cell transplantation in 720 adult patients. *Ann Hematol*. 2014 Feb; 93(2):299–307.
 15. Trecarichi EM, Pagano L, Candoni A, Pastore D, Cattaneo C, Fanci R, et al. Current epidemiology and antimicrobial resistance data for bacterial bloodstream infections in patients with hematologic malignancies: an Italian multicentre prospective survey. *Clin Microbiol Infect*. 2015 Apr; 21(4):337–43.
 16. Cappellano P, Viscoli C, Bruzzi P, Van Lint MT, Pereira CAP, Bacigalupo A. Epidemiology and risk factors for bloodstream infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *New Microbiol*. 2007 Apr; 30(2):89–99.
 17. Bock AM, Cao Q, Ferrieri P, Young J-AH, Weisdorf DJ. Bacteremia in blood or marrow transplantation patients: clinical risk factors for infection and emerging antibiotic resistance. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013 Jan; 19(1):102–8.
 18. Bassetti M, Righi E. Multidrug-resistant bacteria: what is the threat? *Hematology*. 2013 Dec 1; 2013(1):428–32.
 19. Gudiol C, Garcia-Vidal C, Arnan M, Sánchez-Ortega I, Patiño B, Duarte R, et al. Etiology, clinical features and outcomes of pre-engraftment and post-engraftment bloodstream infection in hematopoietic SCT recipients. *Bone Marrow Transplant*. 2014 Jun 24; 49(6):824–30.
 20. Mikulska M, Del Bono V, Raiola AM, Bruno B, Gualandi F, Occhini D, et al. Blood stream infections in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients: reemergence of Gram-negative rods and increasing antibiotic resistance. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009 Jan; 15(1):47–53.
 21. Mikulska M, Viscoli C, Orasch C, Livermore DM, Averbuch D, Cordonnier C, et al. Aetiology and resistance in bacteraemias among adult and paediatric haematology and cancer patients. *J Infect*. 2014 Apr; 68(4):321–31.
 22. Mendes ET, Dulley F, Basso M, Batista MV, Coracin F, Guimarães T, et al. Healthcare-associated infection in hematopoietic stem cell transplantation patients: Risk factors and impact on outcome. *Int J Infect Dis*. 2012;16(6):424–8.

23. Ferreira AM, Moreira F, Guimaraes T, Spadão F, Ramos JF, Batista MV, et al. Epidemiology, risk factors and outcomes of multi-drug resistant bloodstream infections in hematopoietic stem cell transplant recipients: importance of previous gut colonisation. *J Hosp Infect.* 2018. DOI: 10.1016/j.jhin.2018.03.004
24. Mikulska M, Del Bono V, Bruzzi P, Raiola AM, Gualandi F, Van Lint MT, et al. Mortality after bloodstream infections in allogeneic haematopoietic stem cell transplant (HSCT) recipients. *Infection.* 2012 Jun 21; 40(3):271–8.
25. Hakki M, Limaye AP, Kim HW, Kirby KA, Corey L, Boeckh M. Invasive *Pseudomonas aeruginosa* infections: high rate of recurrence and mortality after hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2007 Jun 2; 39(11): 687–93.
26. Rhomberg PR, Jones RN. Summary trends for the Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection Program: a 10-year experience in the United States (1999-2008). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009;65(4):414–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.08.020>
27. Eagye KJ, Banevicius MA, Nicolau DP. *Pseudomonas aeruginosa* is not just in the intensive care unit any more: implications for empirical therapy. *Crit Care Med.* 2012 Apr; 40(4):1329–32.
28. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2010. Surveillance Report. 2012. p. 202. Available from: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2012.pdf>.
29. Satlin MJ, Jenkins SG, Walsh TJ. The global challenge of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in transplant recipients and patients with hematologic malignancies. *Clin Infect Dis.* 2014 May 1; 58(9): 1274–83.
30. Chaves L, Tomich LM, Salomão M, Leite GC, Ramos J, Martins RR, et al. High mortality of bloodstream infection outbreak caused by carbapenem-resistant *P. aeruginosa* producing SPM-1 in a bone marrow transplant unit. *J Med Microbiol.* 2017;66(12):1722–9.
31. Tuon FF, Gortz LW, Rocha JL. Risk factors for pan-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia and the adequacy of antibiotic therapy. *Braz J Infect Dis.* 2012 Jul; 16(4):351–6.
32. Cheong HS, Kang C-I, Wi YM, Ko KS, Chung DR, Lee NY, et al. Inappropriate initial antimicrobial therapy as a risk factor for mortality in patients with community-onset *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2008 Dec 25; (12):1219–25.
33. Morata L, Cobos-Trigueros N, Martínez JA, Soriano Á, Almela M, Marco F, et al. Influence of multidrug resistance and appropriate empirical therapy on the 30-day mortality rate of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Sep; 56(9):4833–7.

34. Gustinetti G, Mikulska M. Bloodstream infections in neutropenic cancer patients: A practical update. *Virulence*. 2016; 7(3):280–97. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/21505594.2016.1156821>
35. Andria N, Henig O, Kotler O, Domchenko A, Oren I, Zuckerman T, et al. Mortality burden related to infection with carbapenem-resistant Gram-negative bacteria among haematological cancer patients: a retrospective cohort study. *J Antimicrob Chemother*. 2015 Nov; 70(11): 3146–53.
36. Liew Y-X, Tan T-T, Lee W, Ng J-L, Chia D-Q, Wong G-C, et al. Risk factors for extreme-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections in patients with hematologic malignancies. *Am J Infect Control*. 2013 Feb; 41(2): 140–4.
37. Migiyama Y, Yanagihara K, Kaku N, Harada Y, Yamada K, Nagaoka K, et al. *Pseudomonas aeruginosa* Bacteremia among Immunocompetent and Immunocompromised Patients: Relation to Initial Antibiotic Therapy and Survival. *Jpn J Infect Dis*. 2016; 69(2): 91–6.
38. Oliveira AL, de Souza M, Carvalho-Dias VMH, Ruiz MA, Silla L, Tanaka PY, et al. Epidemiology of bacteremia and factors associated with multi-drug-resistant gram-negative bacteremia in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant*. 2007 Jun 16; 39(12): 775–81. Available from: <http://www.nature.com/articles/1705677>
39. Garnica M, Maiolino A, Nucci M. Factors associated with bacteremia due to multidrug-resistant Gram-negative bacilli in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Brazilian J Med Biol Res*. 2009 Mar; 42(3):289–93.
40. Nesher L, Rolston KVI, Shah DP, Tarrand JT, Mulanovich V, Ariza-Heredia EJ, et al. Fecal colonization and infection with *Pseudomonas aeruginosa* in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transpl Infect Dis*. 2015 Feb; 17 (1): 33–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/tid.12323>
41. Bilinski J, Robak K, Peric Z, Marchel H, Karakulska-Prystupiuik E, Halaburda K, et al. Impact of Gut Colonization by Antibiotic-Resistant Bacteria on the Outcomes of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Retrospective, Single-Center Study. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016 Jun; 22(6): 1087–93.
42. Wisplinghoff H, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Current trends in the epidemiology of nosocomial bloodstream infections in patients with hematological malignancies and solid neoplasms in hospitals in the United States. *Clin Infect Dis*. 2003 May 1; 36(9): 1103–10. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/374339>
43. Cherif H, Kronvall G, Björkholm M, Kalin M. Bacteraemia in hospitalised patients with malignant blood disorders: a retrospective study of causative agents and their resistance profiles during a 14-year period without antibacterial prophylaxis. *Hematol J Off J Eur Haematol Assoc*. 2003; 4(6): 420–6. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.thj.6200334>
44. Velasco E, Byington R, Martins CSA, Schirmer M, Dias LCM, Gonçalves

- VMSC. Bloodstream infection surveillance in a cancer centre: a prospective look at clinical microbiology aspects. *Clin Microbiol Infect*. 2004 Jun; 10(6): 542–9.
45. Aubron C, Poirel L, Fortineau N, Nicolas P, Collet L, Nordmann P. Nosocomial spread of *Pseudomonas aeruginosa* isolates expressing the metallo-beta-lactamase VIM-2 in a hematology unit of a French hospital. *Microb Drug Resist*. 2005 Sep; 11(3): 254–9. Available from: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/mdr.2005.11.254>
 46. Mencacci A, Cenci E, Repetto A, Mazzola R, Bistoni F, Aversa F et al. A multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from a lethal case of sepsis induces necrosis of human neutrophils. *J Infect*. 2006 Dec; 53(6): e259–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16650478>
 47. Micol JB, de Botton S, Guieze R, Coiteux V, Darre S, Dessein R, et al. An 18-case outbreak of drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bacteriemia in hematology patients. *Haematologica*. 2006 Aug; 91(8): 1134–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16885056>
 48. Gil L, Styczynski J, Komarnicki M. Infectious complication in 314 patients after high-dose therapy and autologous hematopoietic stem cell transplantation: risk factors analysis and outcome. *Infection*. 2007 Dec 9; 35(6): 421–7. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s15010-007-6350-2>
 49. Kalai Blagui S, Achour W, Abbassi MS, Bejaoui M, Abdeladhim A, Ben Hassen A. Nosocomial outbreak of OXA-18-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Tunisia. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2007 Aug [cited 2018 Mar 22];13(8):794–800. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X14634182>
 50. Corvec S, Poirel L, Espaze E, Giraudeau C, Drugeon H, Nordmann P. Long-term evolution of a nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-2 metallo-enzyme. *J Hosp Infect*. 2008 Jan;68(1):73–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18079018>
 51. Johnson LE, D'Agata EMC, Paterson DL, Clarke L, Qureshi ZA, Potoski BA, et al. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia over a 10-year period: multidrug resistance and outcomes in transplant recipients. *Transpl Infect Dis*. 2009 Jun; 11(3): 227–34. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1399-3062.2009.00380.x>
 52. Caselli D, Cesaro S, Ziino O, Zanazzo G, Manicone R, Livadiotti S, et al. Multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection in children undergoing chemotherapy and hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2010 Sep 1; 95(9): 1612–5.
 53. Paez J, Levin AS, Fu L, Basso M, Fonseca GHH, Dulley FL, et al. Clusters of infection due to metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in stem cell transplant and haematology units. *J Hosp Infect*. 2011 Jan; 77(1): 76–7.
 54. Nagao M, Iinuma Y, Igawa J, Saito T, Yamashita K, Kondo T, et al.

- Control of an outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a haemato-oncology unit. *J Hosp Infect.* 2011 Sep; 79(1): 49–53.
55. Kanda M, Shigematsu A, Okada K, Kasahara I, Iwasaki J, Yamaguchi K, et al. Successful combination therapy by meropenem and colistin for multi-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection after allogeneic bone marrow transplantation. *Rinsho Ketsueki.* 2011 Mar;52(3):118–23.
56. Joosten A, Maertens J, Verhaegen J, Lodewyck T, Vermeulen E, Lagrou K. High incidence of bloodstream infection detected by surveillance blood cultures in hematology patients on corticosteroid therapy. *Support Care Cancer.* 2012 Nov 9; 20(11):3013–7.
57. Ghosh I, Raina V, Kumar L, Sharma A, Bakhshi S, Thulkar S, et al. Profile of infections and outcome in high-risk febrile neutropenia: experience from a tertiary care cancer center in India. *Med Oncol.* 2012 Jun 20; 29(2):1354–60.
58. Mudau M, Jacobson R, Minenza N, Kuonza L, Morris V, Engelbrecht H, et al. Outbreak of multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection in the haematology unit of a South African Academic Hospital. Cornelis P, editor. *PLoS One.* 2013 Mar 14; 8(3): e55985.
59. Metan G, Demiraslan H, Kaynar LG, Zararsiz G, Alp E, Eser B. Factors influencing the early mortality in haematological malignancy patients with nosocomial Gram negative bacilli bacteraemia: a retrospective analysis of 154 cases. *Brazilian J Infect Dis.* 2013 Mar;17(2):143–9.
60. Wang L, Wang Y, Fan X, Tang W, Hu J. Prevalence of Resistant Gram-Negative Bacilli in Bloodstream Infection in Febrile Neutropenia Patients Undergoing Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Medicine (Baltimore).* 2015; 94(45): e1931.
61. Stoma I, Karpov I, Milanovich N, Uss A, Iskrov I. Risk factors for mortality in patients with bloodstream infections during the pre-engraftment period after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood Res.* 2016; 51(2):102–6.
62. Demiraslan H, Cevahir F, Berk E, Metan G, Cetin M, Alp E. Is surveillance for colonization of carbapenem-resistant gram-negative bacteria important in adult bone marrow transplantation units? *Am J Infect Control.* 2017;45(7):735–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajic.2017.01.006>
63. Girmenia C, Bertaina A, Piciocchi A, Perruccio K, Algarotti A, Busca A, et al. Incidence, Risk Factors and Outcome of Pre-engraftment Gram-Negative Bacteremia after Allogeneic and Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation: An Italian Prospective Multicenter Survey. *Clin Infect Dis.* 2017; 65(11): 1884–96.
64. Averbuch D, Tridello G, Hoek J, Mikulska M, Akan H, Yañez San Segundo L, et al. Antimicrobial Resistance in Gram-Negative Rods Causing Bacteremia in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients:

- Intercontinental Prospective Study of the Infectious Diseases Working Party of the European Bone Marrow Transplantation Group. *Clin Infect Dis*. 2017;65(11):1819–28.
65. Kresse H, Belsey MJ, Rovini H. The antibacterial drugs market. *Nat Rev Drug Discov*. 2007 Jan 1;6(1):19–20.
66. Tenover FC. Development and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents: an overview. *Clin Infect Dis*. 2001 Sep 15; 33 Suppl 3(s3):S108-15.
67. Livermore DM. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clin Infect Dis*. 2003 Jan 15;36(Suppl 1):S11-23.
68. Harbarth S, Samore MH. Antimicrobial resistance determinants and future control. *Emerg Infect Dis*. 2005 Jun;11(6):794–801.
69. Chen LF, Chopra T, Kaye KS. Pathogens Resistant to Antibacterial Agents. *Infect Dis Clin North Am*. 2009 Dec;23(4):817–45.
70. Zavascki AP, Carvalhaes CG, Picão RC, Gales AC. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2010 Jan 10;8(1):71–93.
71. Oliver A, Mulet X, López-Causapé C, Juan C. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resist Updat*. 2015;21–22:41–59.
72. Ruppé É, Woerther P-L, Barbier F. Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. *Ann Intensive Care*. 2015;5(1):21.
73. Bush K. Proliferation and significance of clinically relevant β -lactamases. *Ann N Y Acad Sci*. 2013;1277(1):84–90.
74. Pellegrino FLPC, Teixeira LM, Carvalho Md M da GS, Aranha Nouér S, Pinto De Oliveira M, Mello Sampaio JL, et al. Occurrence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol*. 2002 Jul; 40(7):2420–4.
75. Laranjeira VDS, Marchetti DP, Steyer JR, Corção G, Picoli SU. Investigation of metallo-beta-lactamase-producing *Acinetobacter* sp and *Pseudomonas aeruginosa* at an emergency hospital in Porto Alegre, State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010;43(4):462–4.
76. Gales AC, Menezes LC, Silbert S, Sader HS. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother*. 2003 Oct 1;52(4):699–702.
77. Rizek C, Fu L, dos Santos LC, Leite G, Ramos J, Rossi F, et al. Characterization of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates, carrying multiple genes coding for this antibiotic resistance. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2014;13(1):43.
78. El Zowalaty ME, Al Thani AA, Webster TJ, El Zowalaty AE, Schweizer

- HP, Nasrallah GK, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: arsenal of resistance mechanisms, decades of changing resistance profiles, and future antimicrobial therapies. *Future Microbiol.* 2015 Oct [cited 2018 Mar 20];10(10):1683–706.
79. Kumar A, Schweizer HP. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005 Jul 29;57(10):1486–513.
80. Masuda N, Sakagawa E, Ohya S. Substrate Specificities of MexAB-OprM , Pumps in *Pseudomonas aeruginosa* Substrate Specificities of MexAB-OprM , MexCD-OprJ , and MexXY-OprM Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(12):3322–7.
81. Buijs J, Dofferhoff ASM, Mouton JW, Wagenvoort JHT, van der Meer JWM. Concentration-dependency of β -lactam-induced filament formation in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect.* 2008 Apr;14(4):344–9.
82. Moyá B, Beceiro A, Cabot G, Juan C, Zamorano L, Alberti S, et al. Pan- β -lactam resistance development in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains: Molecular mechanisms, penicillin-binding protein profiles, and binding affinities. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(9):4771–8.
83. Bassetti M, Righi E. Multidrug-resistant bacteria: what is the threat? *Hematol Am Soc Hematol Educ Progr.* 2013;2013:428–32.
84. Paul M, Grozinsky-Glasberg S, Soares-Weiser K, Leibovici L. Beta lactam antibiotic monotherapy versus beta lactam-aminoglycoside antibiotic combination therapy for sepsis. In: Paul M, editor. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2006.
85. Tanimoto K, Tomita H, Fujimoto S, Okuzumi K, Ike Y. Fluoroquinolone Enhances the Mutation Frequency for Meropenem-Selected Carbapenem Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*, but Use of the High-Potency Drug Doripenem Inhibits Mutant Formation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Oct 1;52(10):3795–800.
86. Le Thomas I, Couetdic G, Clermont O, Brahimi N, Plésiat P, Bingen E. In vivo selection of a target/efflux double mutant of *Pseudomonas aeruginosa* by ciprofloxacin therapy. *J Antimicrob Chemother.* 2001;48(4):553–5.
87. Bucaneve G, Micozzi A, Menichetti F, Martino P, Dionisi MS, Martinelli G, et al. Levofloxacin to Prevent Bacterial Infection in Patients with Cancer and Neutropenia. *N Engl J Med.* 2005 Sep 8; 353(10):977–87.
88. Rigatto MH, Vieira FJ, Antochévis LC, Behle TF, Lopes NT, Zavasckic AP. Polymyxin B in combination with antimicrobials lacking in vitro activity versus polymyxin B in monotherapy in critically ill patients with *Acinetobacter baumannii* or *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(10):6575–80.
89. Averbuch D, Cordonnier C, Livermore DM, Mikulska M, Orasch C, Viscoli C, et al. Targeted therapy against multi-resistant bacteria in leukemic and hematopoietic stem cell transplant recipients: guidelines of the 4th European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-4, 2011).

- Haematologica. 2013 Dec 1;98(12):1836–47.
90. Pillai SK; Moellering RC; Eliopoulos GM. Antimicrobial combinations. Antibiotics in laboratory medicine. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2005.
 91. Bonapace CR, White RL, Friedrich L V, Bosso JA. Evaluation of antibiotic synergy against *Acinetobacter baumannii*: a comparison with Etest, time-kill, and checkerboard methods. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2000 Sep;38(1):43–50.
 92. Rybak MJ, McGrath BJ. Combination antimicrobial therapy for bacterial infections. Guidelines for the clinician. *Drugs*. 1996 Sep;52(3):390–405.
 93. Cappelletty DM, Rybak MJ. Comparison of methodologies for synergism testing of drug combinations against resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996 Mar;40(3):677–83.
 94. Bonapace CR, Bosso JA, Friedrich L V, White RL. Comparison of methods of interpretation of checkerboard synergy testing. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2002 Dec; 44(4):363–6.
 95. McGhee P, Clark C, Credito K, Beachel L, Pankuch GA, Appelbaum PC, et al. In vitro activity of fusidic acid (CEM-102, sodium fusidate) against *Staphylococcus aureus* isolates from cystic fibrosis patients and its effect on the activities of tobramycin and amikacin against *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(5):2417–9.
 96. Lingscheid T, Tobudic S, Poepl W, Mitteregger D, Burgmann H. In vitro activity of doripenem plus fosfomycin against drug-resistant clinical blood isolates. *Pharmacology*. 2013; 91(3–4):214–8.
 97. Vidailac C, Benichou L, Duval RE. In vitro synergy of colistin combinations against colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(9):4856–61.
 98. He W, Kaniga K, Lynch AS, Flamm RK, Davies TA. In vitro Etest synergy of doripenem with amikacin, colistin, and levofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* with defined carbapenem resistance mechanisms as determined by the Etest method. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012;74(4):417–9.
 99. Leite GC, Oliveira MS, Perdigão-Neto LV, Rocha CKD, Guimarães T, Rizek C, et al. Antimicrobial combinations against pan-resistant *acinetobacter baumannii* isolates with different resistance mechanisms. *PLoS One*. 2016;11(3):1–16.
 100. Pereira SG, Rosa AC, Ferreira AS, Moreira LM, Proença DN, Morais P V., et al. Virulence factors and infection ability of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a hydropathic facility and respiratory infections. *J Appl Microbiol*. 2014;116(5):1359–68.
 101. Jeannot K, Elsen S, Köhler T, Attree I, Van Delden C, Plésiat P. Resistance and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains

- overproducing the MexCD-OprJ efflux pump. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(7):2455–62.
102. Bone RC. Gram-negative sepsis: a dilemma of modern medicine. *Clin Microbiol Rev*. 1993 Jan;6(1):57–68.
 103. Smith RS, Iglewski BH. *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Curr Opin Microbiol*. 2003 Feb; 6(1): 56–60.
 104. Head NE, Yu H. Cross-sectional analysis of clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: biofilm formation, virulence, and genome diversity. *Infect Immun*. 2004 Jan;72(1):133–44.
 105. Sawa T, Ohara M, Kurahashi K, Twining SS, Frank DW, Doroques DB, et al. In vitro cellular toxicity predicts *Pseudomonas aeruginosa* virulence in lung infections. *Infect Immun*. 1998 Jul;66(7):3242–9.
 106. Engel J, Balachandran P. Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. *Curr Opin Microbiol*. 2009 Feb;12(1):61–6.
 107. Peña C, Cabot G, Gómez-Zorrilla S, Zamorano L, Ocampo-Sosa A, Murillas J, et al. Influence of virulence genotype and resistance profile in the mortality of *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. *Clin Infect Dis*. 2015 Feb 15;60(4):539–48.
 108. Silva L V, Galdino ACM, Nunes APF, dos Santos KRN, Moreira BM, Cacci LC, et al. Virulence attributes in Brazilian clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Med Microbiol*. 2014 Nov;304(8):990–1000.
 109. Lavenir R, Jocktane D, Laurent F, Nazaret S, Cournoyer B. Improved reliability of *Pseudomonas aeruginosa* PCR detection by the use of the species-specific *ecfX* gene target. *J Microbiol Methods*. 2007 Jul;70(1):20–9.
 110. Gonçalves Pereira S, Cristina Rosa A, Cardoso O. Virulence factors as predictive tools for drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Virulence*. 2015;6.
 111. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrener P, Hickey MJ, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*. 2000;406(6799):959–64.
 112. Dettman JR, Rodrigue N, Aaron SD, Kassen R. Evolutionary genomics of epidemic and nonepidemic strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Dec 24;110(52):21065–70.
 113. Jeukens J, Boyle B, Kukavica-Ibrulj I, Ouellet MM, Aaron SD, Charette SJ, et al. Comparative genomics of isolates of a *Pseudomonas aeruginosa* epidemic strain associated with chronic lung infections of cystic fibrosis patients. *PLoS One*. 2014;9(2):1–15.
 114. Maiden MCJ. Multilocus Sequence Typing of Bacteria. *Annu Rev Microbiol*. 2006 Oct;60(1):561–88.
 115. Labarca JA, Salles MJC, Seas C, Guzmán-Blanco M. Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in

- the nosocomial setting in Latin America. *Crit Rev Microbiol*. 2016;42(2):276–92.
116. de Almeida Silva K de CF, Calomino MA, Deutsch G, de Castilho SR, de Paula GR, Esper LMR, et al. Molecular characterization of multidrug-resistant (MDR) *Pseudomonas aeruginosa* isolated in a burn center. *Burns*. 2017;43(1):137–43.
117. Rhee J-Y, Kwon KT, Ki HK, Shin SY, Jung DS, Chung D-R, et al. Scoring systems for prediction of mortality in patients with intensive care unit-acquired sepsis: a comparison of the Pitt bacteremia score and the Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II scoring systems. *Shock*. 2009 Feb;31(2):146–50.
118. Levin AS, Oliveira MS, Dias MBS LR. Guia de utilização de anti-infecciosos e Recomendações para a prevenção de infecções hospitalares. 5th ed. São Paulo; 2012.
119. Testing S. M100-S25 Performance Standards for Antimicrobial. 2014.
120. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. [cited 2018 Mar 29]; Available from: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_8.0_Breakpoint_Tables.pdf
121. Eliopoulos GM MR. Antimicrobial combinations. In: Lorian V, editor. *Antibiotic in Laboratory Medicine*. 4th ed. Baltimore: Williams and Wilkins; 1996. p. 330–96.
122. Sheng WH, Wang JT, Li SY, Lin YC, Cheng A, Chen YC, 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(3):380–6.
123. Petersen PJ, Labthavikul P, Jones CH, Bradford PA. In vitro antibacterial activities of tigecycline in combination with other antimicrobial agents determined by chequerboard and time-kill kinetic analysis. *J Antimicrob Chemother*. 2006;57(3):573–6.
124. Shi H, Trinh Q, Xu W, Zhai B, Luo Y, Huang K. A universal primer multiplex PCR method for typing of toxinogenic *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012;95(6):1579–87.
125. Mendes RE, Kiyota KA, Monteiro J, Castanheira M, Andrade SS, Gales AC, et al. Rapid detection and identification of metallo- β -lactamase-encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. *J Clin Microbiol*. 2007;45(2):544–7.
126. Bradford PA, Bratu S, Urban C, Visalli M, Mariano N, Landman D, et al. Emergence of Carbapenem-Resistant *Klebsiella* Species Possessing the Class A Carbapenem-Hydrolyzing KPC-2 and Inhibitor-Resistant TEM-30 β -Lactamases in New York City. *Clin Infect Dis*. 2004 Jul 1;39(1):55–60.

127. Chen Z, Qiu S, Wang Y, Wang Y, Liu S, Wang Z, et al. Coexistence of blaNDM-1 with the Prevalent blaOXA23 and blaIMP in Pan-drug Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates in China. *Clin Infect Dis*. 2011 Mar 1;52(5):692–3.
128. Yakupogullari Y, Otlu B, Dogukan M, Gursoy C, Korkmaz E, Kizirgil A, et al. Investigation of a nosocomial outbreak by alginate-producing pan-antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Infect Control*. 2008 Dec;36(10):e13-8.
129. Faria NA, Carrico JA, Oliveira DC, Ramirez M, De Lencastre H. Analysis of typing methods for epidemiological surveillance of both methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol*. 2008;46(1):136–44.
130. Assefa S, Keane TM, Otto TD, Newbold C, Berriman M. ABACAS: algorithm-based automatic contiguation of assembled sequences. *Bioinformatics*. 2009 Aug 1;25(15):1968–9.
131. Seemann T. Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*. 2014;30(14):2068–9.
132. Larsen M V., Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H, Marvig RL, et al. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J Clin Microbiol*. 2012;50(4):1355–61.
133. Kleinbaum D. Survival analysis: a self-learning text. 1a ed. New York: Springer Open Ltd; 1996. 324 p.
134. Bussab, W ; Morettin P. Estatística Básica. 6a ed. São Paulo: Saraiva; 2006.
135. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: The WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis*. 2017;18.
136. Chaves L, Tomich LM, Salomão M, Leite GC, Ramos J, Martins RR, et al. High mortality of bloodstream infection outbreak caused by carbapenem-resistant *P. aeruginosa* producing SPM-1 in a bone marrow transplant unit. *J Med Microbiol*. 2017;66(12).
137. Rodríguez-Baño J, Gutiérrez-Gutiérrez B, Machuca I, Pascual A. Treatment of Infections Caused by Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-, AmpC-, and Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Rev*. 2018 Apr 14;31(2):e00079-17.
138. Buehrle DJ, Shields RK, Clarke LG, Potoski BA, Clancy CJ, Nguyen MH. Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Bacteremia: Risk Factors for Mortality and Microbiologic Treatment Failure. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017 Jan;61(1):e01243-16.
139. Wang X, Zhang L, Sun A, Yang X, Sang W, Jiang Y, et al. *Acinetobacter baumannii* bacteraemia in patients with haematological malignancy: a multicentre retrospective study from the Infection Working Party of Jiangsu Society of Hematology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*.

- 2017;36(7):1073–81.
140. Kim S-H, Choi J-K, Cho S-Y, Lee H-J, Park SH, Choi S-M, et al. Risk factors and clinical outcomes of breakthrough yeast bloodstream infections in patients with hematological malignancies in the era of newer antifungal agents. *Med Mycol.* 2017;(May 2017):197–206.
 141. Simner PJ, Martin I, Opene B, Tamma PD, Carroll KC, Milstone AM. Evaluation of multiple methods for detection of gastrointestinal colonization of carbapenem-resistant organisms from rectal swabs. *J Clin Microbiol.* 2016;54(6):1664–7.
 142. Sadowska-Klasa A, Piekarska A, Prejzner W, Bieniaszewska M, Hellmann A. Colonization with multidrug-resistant bacteria increases the risk of complications and a fatal outcome after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Ann Hematol.* 2017;509–17.
 143. Forcina A, Lorentino F, Marasco V, Oltolini C, Marcatti M, Greco R, et al. Clinical Impact of Pre-Transplant Multidrug-Resistant Gram-Negative Colonization in Autologous and Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2018; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1083879118301071>
 144. Taplitz RA, Kennedy EB, Bow EJ, Crews J, Gleason C, Hawley DK, et al. Outpatient Management of Fever and Neutropenia in Adults Treated for Malignancy: American Society of Clinical Oncology and Infectious Diseases Society of America Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol* [Internet]. 2018; JCO.2017.77.621.
 145. Carrara-Marroni FE, Cayô R, Streling AP, da Silva ACR, Palermo RL, Romanin P, et al. Emergence and spread of KPC-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a Brazilian teaching hospital. *J Glob Antimicrob Resist.* 2015 Dec;3(4):304–6.
 146. Pfaller MA, Shortridge D, Sader HS, Gales A, Castanheira M, Flamm RK. Ceftolozane-tazobactam activity against drug-resistant Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* causing healthcare-associated infections in Latin America: report from an antimicrobial surveillance program (2013-2015). *Braz J Infect Dis.* 2017 Nov;21(6):627–37.
 147. Martins WMBS, Narciso AC, Cayô R, Santos SV, Fehlberg LCC, Ramos PL, et al. SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST277 clone recovered from microbiota of migratory birds. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2018;90(3):221–7.
 148. Grignolo S, Tatarelli P, Guolo F, Minetto P, Rivoli G, Guardo D, et al. Good tolerability of high dose colistin-based therapy in patients with haematological malignancies. *Infection.* 2017 Aug 28;45(4):505–11.
 149. Prim N, Turbau M, Rivera A, Rodríguez-Navarro J, Coll P, Mirelis B. Prevalence of colistin resistance in clinical isolates of Enterobacteriaceae: A four-year cross-sectional study. *J Infect.* 2017 Dec;75(6):493–8.
 150. Del Barrio-Tofiño E, López-Causapé C, Cabot G, Rivera A, Benito N,

- Segura C, et al. Genomics and Susceptibility Profiles of Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017 Nov;61(11):e01589-17.
151. Akpaka PE, Swanston WH, Ihemere HN, Correa A, Torres JA, Tafur JD, et al. Emergence of KPC-Producing *Pseudomonas aeruginosa* in Trinidad and Tobago. *J Clin Microbiol*. 2009 Aug 1;47(8):2670–1.
152. De Araújo Jácome PRL, Rodrigues Alves L, Borges Cabral A, Lopes ACS, Vieira Maciel MA. First report of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(9):4990.
153. Toleman MA. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother*. 2002;50(5):673–9.
154. Franco MRG, Caiaffa-Filho HH, Burattini MN, Rossi F. Metallo-beta-lactamases among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian university hospital. *Clinics (Sao Paulo)*. 2010;65(9):825–9.
155. Giani T, Arena F, Pollini S, Di Pilato V, D'Andrea MM, Henrici De Angelis L, et al. Italian nationwide survey on *Pseudomonas aeruginosa* from invasive infections: activity of ceftolozane/tazobactam and comparators, and molecular epidemiology of carbapenemase producers. *J Antimicrob Chemother*. 2017 Dec 5;73(3):664–71.
156. Zusman O, Avni T, Leibovici L, Adler A, Friberg L, Stergiopoulou T, et al. Systematic review and meta-analysis of in vitro synergy of polymyxins and carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(10):5104–11.
157. Hu Y, Li L, Li W, Xu H, He P, Yan X, et al. Combination antibiotic therapy versus monotherapy for *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia: a meta-analysis of retrospective and prospective studies. *Int J Antimicrob Agents*. 2013 Dec;42(6):492–6.
158. He W, Kaniga K, Lynch AS, Flamm RK, Davies TA. In vitro Etest synergy of doripenem with amikacin, colistin, and levofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* with defined carbapenem resistance mechanisms as determined by the Etest method. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012 Dec;74(4):417–9.
159. Ripa M, Rodríguez-Núñez O, Cardozo C, Naharro-Abellán A, Almela M, Marco F, et al. Influence of empirical double-active combination antimicrobial therapy compared with active monotherapy on mortality in patients with septic shock: a propensity score-adjusted and matched analysis. *J Antimicrob Chemother*. 2017 Dec 1;72(12):3443–52.
160. Peña C, Suarez C, Ocampo-Sosa A, Murillas J, Almirante B, Pomar V, et al. Effect of Adequate Single-Drug vs Combination Antimicrobial Therapy on Mortality in *Pseudomonas aeruginosa* Bloodstream Infections: A Post Hoc Analysis of a Prospective Cohort. *Clin Infect Dis*. 2013 Jul 15;57(2):208–16.
161. Paul M, Daikos GL, Durante-Mangoni E, Yahav D, Carmeli Y, Benattar

- YD, et al. Colistin alone versus colistin plus meropenem for treatment of severe infections caused by carbapenem-resistant Gram-negative bacteria: an open-label, randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis*. 2018 Apr;18(4):391–400.
162. Juan C, Peña C, Oliver A. Host and pathogen biomarkers for severe *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Infect Dis*. 2017;215(March):S44–51.
163. Thaden JT, Park LP, Maskarinec SA, Ruffin F, Fowler VG, Duin V. Cohort Study Show Increased Mortality Caused by *Pseudomonas aeruginosa* Compared to Other Bacteria. 2017;61(6):1–11.
164. Li J, Chen T, Yuan C, Zhao G, Xu M, Li X, et al. Effect of intravenous immunoglobulin on the function of Treg cells derived from immunosuppressed mice with *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. Metzger DW, editor. *PLoS One*. 2017 May 8;12(5):e0176843.
165. Rossmann FS, Kropec A, Laverde D, Saaverda FR, Wobser D, Huebner J. In vitro and in vivo activity of hyperimmune globulin preparations against multiresistant nosocomial pathogens. *Infection*. 2015 Apr 27;43(2):169–75.
166. Azık F, Bayram C, Erkoçoğlu M, Tezer H, Yazal Erdem A, Işık P, et al. Comparison of prophylactic use of intravenous immunoglobulin versus Pentaglobin® in pediatric patients after hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatr Transplant*. 2016 Mar;20(2):276–83.
167. Suzuki M, Yamada K, Aoki M, Hosoba E, Matsumoto M, Baba H, et al. Applying a PCR-based open-reading frame typing method for easy genotyping and molecular epidemiological analysis of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Appl Microbiol*. 2016;120(2):487–97.
168. Silveira M, Albano R, Asensi M, Assef APC. The draft genome sequence of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain CCBH4851, a nosocomial isolate belonging to clone SP (ST277) that is prevalent in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014;109(8):1086–7.
169. Hopkins KL, Meunier D, Findlay J, Mustafa N, Parsons H, Pike R, et al. SPM-1 metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST277 in the UK. *J Med Microbiol*. 2016 Jul 1;65(7):696–7.
170. Gómez-Zorrilla S, Juan C, Cabot G, Camoez M, Tubau F, Oliver A, et al. Impact of multidrug resistance on the pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa*: in vitro and in vivo studies. *Int J Antimicrob Agents*. 2016 May;47(5):368–74.
171. Estepa V, Rojo-Bezares B, Azcona-Gutiérrez JM, Olarte I, Torres C, Sáenz Y. Characterisation of carbapenem-resistance mechanisms in clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered in a Spanish hospital. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2017 Mar;35(3):141–7.
172. Chalhoub H, Sáenz Y, Rodríguez-Villalobos H, Denis O, Kahl BC, Tulkens PM, et al. High-level resistance to meropenem in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in the absence of carbapenemases: role of

- active efflux and porin alterations. *Int J Antimicrob Agents*. 2016 Dec;48(6):740–3.
173. Silveira MC, Albano RM, Asensi MD, Carvalho-Assef APD. Description of genomic islands associated to the multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone ST277. *Infect Genet Evol*. 2016 Aug; 42:60–5.
174. Fonseca EL, Vicente ACP. Commentary: Clinical utilization of genomics data produced by the international *Pseudomonas aeruginosa* consortium. *Front Microbiol*. 2016 May 23;7:770.

RESEARCH

Open Access

Characterization of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates, carrying multiple genes coding for this antibiotic resistance

Camila Rizek¹, Liang Fu¹, Leticia Cavalcanti dos Santos¹, Gleice Leite¹, Jessica Ramos², Flavia Rossi³, Thais Guimaraes², Anna S Levin^{1,2} and Silvia Figueiredo Costa^{1,2*}

Abstract

Background: Carbapenemase genes are one of the most frequent mechanisms reported in carbapenem-resistant *P. aeruginosa*; however, description of *P. aeruginosa* co-harboring two or more carbapenemases is unusual.

Methods: In this study we evaluated the presence of carbapenemase genes and the clonality of *P. aeruginosa* isolates obtained from a hospital over a 12-year period. A total of 127 isolates of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* recovered from 109 patients feces (four samples), rectal swab (three samples), nasal swab (one sample) and anal abscess (one sample), were evaluated. Minimum inhibitory concentrations of the following antibiotics imipenem, meropenem and polymyxin E were determined by broth microdilution. The molecular profile of isolates was evaluated by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). PCR for the following carbapenemase genes *bla*_{IMP}, *bla*_{SPM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SIM}, *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{GES} and nucleotide sequencing to confirm the enzyme gene types were performed and compared with the database available on the Internet (BLAST-<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

Results: All isolates were carbapenem-resistant, their MIC₅₀ and MIC₉₀ were respectively 64 µg/mL and 256 µg/mL to imipenem and 32 µg/mL and 256 µg/mL to meropenem, all isolates except one (MIC = 8 mg/L) were susceptible to polymyxin E. The most frequent carbapenemase genes identified were *bla*_{SPM} identified in 41 isolates (32%), followed by 10 with *bla*_{KPC} and 5 with *bla*_{VIM} (3.9%). All belonged to the class SPM-1 and VIM-2. In 2011, one isolate harbouring three carbapenemase genes (SPM-1, VIM-2 and KPC-2) that belonged to a new clone was identified in a hematopoietic stem cell transplanted patient. Then, 19 carbapenem-resistant *P. aeruginosa* were identified in an outbreak that occurred in the bone marrow transplant unit, all positive for SPM-1 gene, and 9 (47.3%) harbored both SPM-1 and KPC.

Conclusion: Our findings showed that PCR for KPC gene should be performed to evaluate carbapenem resistance in *P. aeruginosa* and that this agent can harbor more than one carbapenemase gene. Attention should be focused on the possible rapid spread of KPC in *P. aeruginosa* isolates and for the fact that *P. aeruginosa* may become a reservoir of this transmissible resistance mechanism.

Keywords: Pseudomonas, Carbapenemases, KPC, VIM, SPM

* Correspondence: silviacosta@usp.br

¹Laboratory of Bacteriology of Department of Infectious, Diseases of University of São Paulo, Dr. Eneas Carvalho de Aguiar 470, São Paulo Zip Code 02461011, Brazil

²Department of Infectious, Diseases of University of São Paulo, Dr. Eneas Carvalho de Aguiar 470, São Paulo Zip Code 02461011, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article

Background

Carbapenem-resistant *P. aeruginosa* has become an important problem all over the world challenging the current diagnostic approaches. Carbapenemase genes are one of the most frequent mechanisms reported in carbapenem-resistant *P. aeruginosa* [1-5]. It is important to identify carbapenemase genes transmitted on mobile genetic elements which can lead to the spread of resistance of *P. aeruginosa* to carbapenem, which are the main drugs used to treat infections caused by this agent. In Brazil, the most common carbapenemase is the metallo-beta-lactamase, SPM, however, recently *P. aeruginosa* harboring KPC was identified [2].

In this study, we evaluated the presence of carbapenemase genes and the clonality of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* isolates obtained from a teaching hospital over a 12-year period.

Methods

Study setting

The study was conducted in The *Central Institute of Hospital das Clinicas* (ICHHC – FMUSP), Brazil, a teaching hospital with 1,000 beds, ten intensive care units totalizing 110 beds and a bone marrow transplant ward with 20 beds.

Isolates

A total of 129 *P. aeruginosa* carbapenem-resistant clinical isolates identified over a 12-year period, from 1998 to 2012, recovered from 109 patients, hospitalized in the Clinical and Surgical nursery, Intensive Care, Burned, Haematology and Bone Marrow units at Hospital das Clinicas-FMUSP were evaluated.

Susceptible profile

Minimum inhibitory concentrations (MICs) of imipenem, meropenem and polymixin E were determined by

broth microdilution according with Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI 2012).

Molecular typing

Bacterial isolates were grown on blood agar overnight at 37°C. Gel blocks were made by using equal volumes of 2% low-melting-point agar (BioRad, USA) and a bacterial suspension of 9×10^8 cells. Genomic DNA was digested with 10U of XBAI (Fermentas, USA), [6] (Sekiguchi ref). DNAs were separated by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) using a CHEF-DR III system (Bio-Rad, USA). Running conditions were 21 h at 14°C, with and initial switching time of 1 s and final time of 30 s, at 6 V/cm. PFGE patterns were interpreted according to Tenover *et al.* 1997 [7].

Carbapenemases genes

PCR for the following carbapenemase genes *bla*_{IMP}, *bla*_{SPM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SIM}, *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{GES} was done as described previously [8-11]. The following reference strains were used as control in this study: *P. aeruginosa* that produced IMP-1, VIM-2, SIM-1, SPM-1 [10], KPC ATCC and *E. coli* NDM. Nucleotide sequencing to confirm the enzyme gene types was performed by MegaBACE 1000. The sequences were analyzed using the software Sequence Analyzer with the Base Caller Cimarron 3.12. The genetic sequence was compared with the database available on the Internet (BLAST-http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/). The KPC sequence was also comparing with KPC lahey databases (http://www.lahey.org/Studies/other.asp#table1).

Results

All isolates were carbapenem-resistant, their MIC₅₀ and MIC₉₀ were respectively 64 µg/mL and 256 µg/mL to imipenem and 32 µg/mL and 256 µg/mL to meropenem. All isolates except one (MIC: 8 µg/mL), were susceptible to colistin, MICs varied from 0.25 to 2 µg/mL. They

Figure 1 PCR for detection of SPM gene in *P. aeruginosa* carbapenem-resistant isolates. 1 - SPM Positive Control (amplicon size 798 bp), 3 and 4 - *P. aeruginosa* SPM positive; 5, 6 - Negative Control and 6 - Molecular Weight.

Figure 2 PCR for detection KPC gene in *P. aeruginosa* carbapenem-resistant isolates. 1 – Molecular Weight; 2, 3 – Negative Control; 4 – KPC Positive Control (amplicon size 893 bp); 5, 6 and 7 – *P. aeruginosa* KPC positive.

were recovered from blood (120 samples), feces (four samples), rectal swab (three samples), nasal swab (one sample) and anal abscess (one sample). PFGE showed that, from 1998 to 2009, 25% (27 of 108 strains) belonged to one predominant clone (A1), thirty-two (A2) of 108 isolates (29.7%) were closely related to them and sixteen (14.8%) were possibly related (A3, A4, A5, A6 and A7) to the predominant clone (A1). Thirty-three (30.5%) showed no relation with the predominant clone A1. Among the 129 isolates 50 (39%) harboured a carbapenemase, the most frequent carbapenemase genes identified were *bla_{SPM}* identified in 41 isolates (32%) (Figure 1), followed by 10 with *bla_{KPC}* (Figure 2) and 5 with *bla_{VIM}* (Figure 3). GES-5 was identified only in 3 isolates from one burned patient. *Pseudomonas aeruginosa* harbouring SPM-1 was identified for the first time in the Bone Marrow Transplant unit in 1998, VIM-2 in the Emergency Room in 2001 and GES-5 in the Burned Intensive Care Unit. GenBank accession numbers: JX840596 (VIM-2), JX682700-JX682705 (KPC-2) and JX870518-JX870528 (SPM-1).

In 2012 during an outbreak that occurred in the bone marrow transplant unit, 19 carbapenem-resistant *P. aeruginosa* were identified (clone K, L, L1, L2, L3 and M), all positive for SPM-1 gene, and 10 (47.3%) harboured both SPM-1 and KPC-2. The majority of the KPC, six isolates of nine, belong to the clone of the outbreak (K).

The relation between molecular profile and carbapenemase gene for all period is shown on Table 1.

Discussion

It is the first report of *P. aeruginosa* co-harboring *bla_{KPC}* and *bla_{SPM}* genes and the first report in Brazil of *P. aeruginosa* carrying KPC-2, VIM-2 and SPM-1. SPM-1 was the most frequent carbapenemase identified in our hospital, followed by KPC-2. KPC in *P. aeruginosa* is rare and occurs mainly in the American continent [1-5,12]. Recently, *P. aeruginosa* harbouring KPC was described in Argentina [13] and Iran [14], showing the potential rapid dissemination of this mechanism of resistance to the world.

Figure 3 PCR for detection of VIM gene in *P. aeruginosa* carbapenem-resistant isolates. 1, 6 – Molecular Weight; 2 – VIM Positive Control (amplicon size 382 bp); 3, 4 – *P. aeruginosa* VIM positive and 5 – Negative Control.

Table 1 Carbapenemase genes and clonality of 129 carbapenem-resistant *P. aeruginosa* isolated in Hospital das Clinicas, over a 12-year period

Carbapenemase gene	Number of isolates	PFGE clone	Year of identification
None (n = 79)	27	A1	1998-2008
	25	A2	
	2	A3	
	5	A5	
	8	B	
	6	C	
	2	D	
	2	E	
	2	F	
SPM-1 (n = 33)	7	A2	1998-2012
	3	A3	
	1	A4	
	1	A6	
	1	A7	
	6	G	
	2	I	
	6	L	
	2	L1	
	1	L2	
VIM-2 (n = 4)	1	B	2001-2009
	1	D	
	2	H	
	2	A5	
GES-5 (n = 3)	3	A5	2001
SPM-1 and KPC-2 (n = 9)	6	K ^B	2012
	1	L ^C	
	1	L1 ^D	
	1	M ^E	
SPM-1 and VIM-2 and KPC-2 (n = 1)	1	J ^A	2011

Even though *P. aeruginosa* harbouring KPC was identified in 2010 in Brazil [2], no other report was published since then.

Only 50 of 129 *P. aeruginosa* carbapenem-resistant harboured a carbapenemase evaluated in this study. Thus, the carbapenem resistance could be related to other mechanism of resistance such as outer-membrane protein alteration, efflux system overexpression or new carbapenemase not yet identified [15-17].

Pseudomonas aeruginosa co-harbours carbapenemase is uncommon; there are few reports in the literature [1;3]. *Pseudomonas aeruginosa* isolate co-harbours KPC and a metallo-β-lactamase (IMP-8) was recently reported in Puerto Rico [3] and isolates co-harbours KPC and VIM gene were identified in Colombia [1]. We described a new clone of *P. aeruginosa* co-harbours SPM-1 and KPC-2 that caused an outbreak in a Bone Marrow transplantation unit, and an isolate co-harbours three carbapenemase (SPM-1; KPC-2 and VIM-2) that belonged to a different clone than previously described in two outbreaks that occurred in this unit and were controlled with reinforcement of hand hygiene and contact precautions, one due to *P. aeruginosa* harbouring SPM-1 and other harbouring VIM-2 [18].

This *P. aeruginosa* isolate harbouring KPC-2 was identified for the first time in our hospital in 2011 in a hematopoietic stem cell transplanted patient. It harboured three carbapenemase genes (SPM-1, VIM-2 and KPC-2), and belonged to a new clone (J^A) not identified before in the hospital. This isolate showed a resistant profile to both imipenem and meropenem with MIC of 64 µg/mL and 32 µg /mL, respectively, but was susceptible to polymyxin and colistin with a MIC of 2 µg /mL for both drugs.

In 2012 during an outbreak that occurred in the Bone Marrow Transplant unit, 19 carbapenem-resistant *P. aeruginosa* were identified (clone K, L, L1, L2, L3 and M), all positive for SPM-1 gene, and 10 (47.3%) harbored both SPM-1 and KPC-2. The majority of the KPC, six isolates of ten, belong to the clone of the outbreak (K^B). Our data showed different clones circulating in our hospital and a new one predominate clone harbouring KPC. A recent study also described dissemination of a new clone of *P. aeruginosa* harbouring KPC in a hospital in Argentina after a *K. pneumoniae*-KPC positive outbreak [13].

Other interesting findings of our study are that GES-5 was restricted to the Burned Intensive Care Unit and was identified only in 2001. VIM-1 was first identified in the Emergency Room and then in the Bone Marrow Transplant Unit, and SPM is spread in different units in the hospital. These results were similar with previous Brazilian reports that showed that SPM-1 is endemic in several hospitals in the country [19,20].

The complete sequence of two KPC-harbours plasmids, Plasmid pCOL-1 (31529 bp), IncP-6 replicon group and Plasmid pPA-2 (7995 bp) from *P. aeruginosa* showed that they differing in size and in incompatibility group, and harbouring different genetic structures containing the blaKPC-2 genes [21]. These findings suggest that the carbapenemase resistance dissemination due to KPC in *P. aeruginosa* will be similar to that seen in Enterobacteriaceae. Thus, it is very important to understand the epidemiology of these multiresistant isolates,

in order to achieve early implementation of adequate control measures to contain and reduce their dissemination in the hospital setting. *Pseudomonas aeruginosa* can acquired this transmissible resistance mechanism, going unnoticed and be a source of spread of KPC to other genus and species of bacteria. Besides carbapenem-resistance in *P. aeruginosa* can be due to two or more carbapenemase genes, including KPC-gene.

In conclusion, our findings showed that SPM-1 is the most frequent carbapenemase identified in our hospital, followed by KPC-2. Thus, PCR for KPC gene should be performed to evaluate carbapenem resistance in *P. aeruginosa* and this agent can harbor more than one carbapenemase gene. Attention should be focused on the possible rapid spread of KPC in *P. aeruginosa* isolates and for the fact that *P. aeruginosa* may become a reservoir of this transmissible resistance mechanism.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

Concept and design (SFC), data collection and laboratory work (CR, LF, JR, GL, LCS) data analysis and interpretation (CR, ASL, SFC), drafting of the manuscript (CR, TG, ASL, SFC), critical review of the manuscript (CR, TG, SL, SFC), final approval of manuscript for publication (CR, LF, JR, GL, LCS, TG, ASL, SFC). All authors read and approved the final manuscript.

Funding section

This study was performed using internal funding.

Author details

¹Laboratory of Bacteriology of Department of Infectious, Diseases of University of São Paulo, Dr. Eneas Carvalho de Aguiar 470, São Paulo Zip Code 02461011, Brazil. ²Department of Infectious, Diseases of University of São Paulo, Dr. Eneas Carvalho de Aguiar 470, São Paulo Zip Code 02461011, Brazil. ³Laboratory of Microbiology of Hospital das Clinicas of University of São Paulo, Dr. Eneas Carvalho de Aguiar 255, São Paulo Zip Code 02461011, Brazil.

Received: 22 April 2014 Accepted: 20 August 2014

Published online: 02 September 2014

References

- Correa A, Montealegre MC, Mojica MF, Maya JJ, Rojas LJ, De La Cadena EP, Ruiz SJ, Recalde M, Rosso F, Quinn JP, Villegas MV: **First report of a pseudomonas aeruginosa isolate co-harboring KPC and VIM carbapenemases.** *Antimicrob Agents Chemother* 2012, **56**(10):5422–5423.
- Jácome PR, Alves LR, Cabral AB, Lopes AC, Maciel MA: **First report of KPC-producing pseudomonas aeruginosa in Brazil.** *Antimicrob Agents Chemother* 2012, **56**(9):4990.
- Martínez T, Vázquez GJ, Aquino EE, Ramírez-Ronda R, Robledo IE: **First report of a Pseudomonas aeruginosa clinical isolate co-harboring KPC-2 and IMP-18 carbapenemases.** *Int J Antimicrob Agents* 2012, **39**(6):542–543.
- Cuzon G, Naas T, Villegas MV, Correa A, Quinn JP, Nordmann P: **Wide dissemination of Pseudomonas aeruginosa producing beta-lactamase blaKPC-2 gene in Colombia.** *Antimicrob Agents Chemother* 2011, **55**(11):5350–5353.
- Villegas MV, Lolans K, Correa A, Kattan JN, Lopez JA, Quinn JP, Colombian Nosocomial Resistance Study Group: **First identification of Pseudomonas aeruginosa isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase.** *Antimicrob Agents Chemother* 2007, **51**(4):1553–1555.
- Sekiguchi J, Asagi T, Miyoshi-Akiyama T, Fujino T, Kobayashi I, Morita K, Kikuchi Y, Kuratsuji T, Kirikae T: **Multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa strain that caused an outbreak in a neurosurgery ward and**

- its aac(6)-Iae gene cassette encoding a novel aminoglycoside acetyltransferase. *Antimicrob Agents Chemother* 2005, **49**(9):3734–3742.
- Tenover F, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B: **Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strains typing.** *J Clin Microbiol* 1995, **33**(9):2233–2239.
- Bradford PA, Bratu C, Urban C, Visalli M, Mariano N, Landman D, Rahal JJ, Brooks S, Cebular S, Quale J: **Emergence of carbapenem-resistant Klebsiella species possessing the class A carbapenem hydrolyzing KPC-2 and Inhibitor-resistant TEM30 β -lactamases in New York.** *Clin Infect Dis* 2004, **39**(1):55–60.
- Chen Y, Zhou Z, Zang Y, Yu Y: **Emergence of NDM-1 producing Acinetobacter baumannii in China.** *J Antimicrob Chemother* 2011, **66**(6):1255–1259.
- Mendes ER, Kiyota KA, Monteiro J, Castanheira M, Andrade SS, Gales AC, Pignatari AC, Tufik S: **Rapid detection and identification of Metallo- β -lactamase-encoding genes by multiplex real time PCR assay and melt curve analysis.** *J Clin Microbiol* 2007, **45**(2):544–547.
- Kim SY, Park YJ, Yu JK, Kim HS, Park YS, Yoon JB, Yoo JY, Lee K: **Prevalence and mechanisms of decreased susceptibility to carbapenems in Klebsiella pneumoniae isolates.** *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007, **57**(1):85–91.
- García Ramírez D, Nicola F, Zarate S, Relloso S, Smayevsky J, Arduino S: **Emergence of Pseudomonas aeruginosa with KPC-type carbapenemase in a teaching hospital: an 8-year study.** *J Med Microbiol* 2013, **62**:1565–1570.
- Santella G, Cittadini R, Papalia M, Vera Ocampo C, Del Castillo M, Vay C, Gutkind G, Radice M: **First clonal spread of KPC-producing Pseudomonas aeruginosa in Buenos Aires, Argentina.** *Infect Genet Evol* 2012, **12**(8):2003–2005.
- Lari AR, Azimi L, Rahbar M, Alaghebandan R, Sattarzadeh-Tabrizi M: **First report of Klebsiella pneumonia carbapenemase-producing Pseudomonas aeruginosa isolated from burn patients in Iran: phenotypic and genotypic methods.** *GMS Hyg Infect Control* 2014, **9**(1):Doc06.
- Liu Y, Li XY, Wan LG, Jiang WY, Li FQ, Yang JH: **Efflux system overexpression and decreased OprD contribute to the carbapenem resistance among extended-spectrum beta-lactamase-producing Pseudomonas aeruginosa isolates from a Chinese university hospital.** *Microb Drug Resist* 2013, **19**(6):463–468.
- Castanheira M, Deshpande LM, Costello A, Davies TA, Jones RN: **Epidemiology and carbapenem resistance mechanisms of carbapenem-non-susceptible Pseudomonas aeruginosa collected during 2009–11 in 14 European and Mediterranean countries.** *J Antimicrob Chemother* 2014, **69**(7):1804–1814.
- Aghazadeh M, Hojabri Z, Mahdian R, Nahaei MR, Rahmati M, Hojabri T, Pirzadeh T, Pajand O: **Role of efflux pumps: MexAB-OprM and MexXY (–OprA), AmpC cephalosporinase and OprD porin in non-metallo- β -lactamase producing Pseudomonas aeruginosa isolated from cystic fibrosis and burn patients.** *Infect Genet Evol* 2014, **24**:187–192.
- Paez J, Levin AS, Fu L, Basso M, Fonseca GH, Dulle FL, Rossi F, Guimarães T, Costa SF: **Clusters of infection due to metallo- β -lactamase-producing Pseudomonas aeruginosa in stem cell transplant and haematology units.** *J Hosp Infect* 2011, **77**(1):76–77.
- Camargo CH, Bruder-Nascimento A, Mondelli AL, Montelli AC, Sadatsune T: **Detection of SPM and IMP metallo- β -lactamases in clinical specimens of Pseudomonas aeruginosa from a Brazilian public tertiary hospital.** *Braz J Infect Dis* 2011, **15**(5):478–481.
- Scheffer MC, Gales AC, Barth AL, Carmo Filho JR, Dalla-Costa LM: **Carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa: clonal spread in southern Brazil and in the state of Goiás.** *Braz J Infect Dis* 2010, **14**(5):508–509.
- Naas T, Bonnin RA, Cuzon G, Villegas MV, Nordmann P: **Complete sequence of two KPC-harboring plasmids from Pseudomonas aeruginosa.** *J Antimicrob Chemother* 2013, **68**(8):1757–1762.

doi:10.1186/s12941-014-0043-3

Cite this article as: Rizek et al.: Characterization of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates, carrying multiple genes coding for this antibiotic resistance. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2014 **13**:43.

High mortality of bloodstream infection outbreak caused by carbapenem-resistant *P. aeruginosa* producing SPM-1 in a bone marrow transplant unit

Lucas Chaves,¹ Lísia Moura Tomich,¹ Matias Salomão,¹ Gleice Cristina Leite,² Jessica Ramos,¹ Roberta Ruedas Martins,¹ Camila Rizek,² Patricia Neves,² Marjorie Vieira Batista,¹ Ulysses Amigo,³ Thais Guimaraes,⁴ Anna Sara Levin^{1,2} and Silvia Figueiredo Costa^{1,2,*}

Abstract

Purpose. Carbapenem resistance in *P. aeruginosa* is increasing worldwide. In Brazil, SPM-1 is the main *P. aeruginosa* carbapenemase identified. Little is known about the virulence factor in SPM-1 clones.

Methodology. We describe a carbapenem-resistant *P. aeruginosa* bloodstream infection (CRPa-BSI) outbreak in a bone marrow transplant Unit (BMT). Twenty-nine CRPa-BSI cases were compared to 58 controls. Microbiological characteristics of isolates, such as sensitivity, carbapenemase gene PCR for *P. aeruginosa*, and PFGE are described, as well as the whole-genome sequence (WGS) of three strains.

Results/Key findings. The cultures from environmental and healthcare workers were negative. Some isolates harboured KPC and SPM. The WGS showed that the 03 strains belonged to ST277, presented the same mutations in outer membrane protein, efflux pump, and virulence genes such as those involved in adhesion, biofilm, quorum-sensing and the type III secretion system, but differ regarding the carbapenemase profile. A predominant clone-producing SPM harbouring Tn 4371 was identified and showed cross-transmission; no common source was found. Overall mortality rate among cases was 79 %. The first multivariate analysis model showed that neutropenia ($P=0.018$), GVHD prophylaxis ($P=0.016$) and prior use of carbapenems ($P=0.0089$) were associated with CRPa-BSI. However, when MASCC ≥ 21 points and platelets were added in the final multivariate analysis, only prior use of carbapenems remained as an independent risk factor for CRPa-BSI ($P=0.043$).

Conclusions. The predominant clone belonging to ST277 showed high mortality. Carbapenem use was the only risk factor associated with CRPa-BSI. This finding is a wake-up call for the need to improve management in BMT units.

INTRODUCTION

Bloodstream infections (BSI) are related to increased morbidity and mortality in haematopoietic stem cell transplant (HSCT) patients [1, 2]. Since the last decade, an increasing incidence of BSI due to Gram-negative bacilli (GNB) has been described, including non-fermenting bacteria [2] relative to Gram-positive bacteria (GPB) [3, 4] in this population. Multidrug-resistant (MDR) bacterial infection contributes to higher rates of death and economic burden [2–4].

P. aeruginosa infections are usually related to high mortality rates in HSCT patients [5, 6], and this can be attributed to many virulent factors such as biofilm production, endotoxins, the type III secretion system and ‘quorum sensing’ [7]. Bloodstream infection caused by *P. aeruginosa* isolates harbouring the type III secretion system including three exotoxins (ExoU, ExoT and ExoS) has been associated with poor outcome [8–10]. Recently, Peña *et al.* [9] demonstrated a significant association of *exoU*-positive *P. aeruginosa* isolates with early mortality in patients with BSI.

Received 13 June 2017; Accepted 20 October 2017

Author affiliations: ¹Department of Infectious Diseases, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; ²Laboratory of Bacteriology-LIM54, Hospital das Clínicas, Institute of Tropical Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; ³Bone Marrow Transplantation Unit, Hospital das Clínicas, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; ⁴Infection Control Committee, Hospital das Clínicas, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

***Correspondence:** Silvia Figueiredo Costa, costasilviaf@ig.com.br

Keywords: carbapenem-resistant; *Pseudomonas aeruginosa*; virulence; whole genome sequence.

Abbreviations: BMT, Bone Marrow Transplant; CRPa-BSI, carbapenems-resistant *P. aeruginosa* bloodstream infection; CVC, central venous catheter; GNB, Gram-negative bacilli; GPB, Gram-positive bacteria; GVHD, graft versus host disease; HSCT, Hematopoietic Stem Cell Transplant; KPC, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase; LTC, long-term catheter; MDR, multidrug-resistant; MLST, multilocus sequence typing; MASCC score, Multinational Association for Supportive Care in Cancer; PFGE, pulsed field gel electrophoresis; SNPs, single nucleotide polymorphisms; SPM, São Paulo metallo- β -lactamase; ST, sequence type; TBI, total body irradiation; Tn, Transposon; WGS, whole genome sequence.

Many types of metallo- β -lactamases (MBLs) have been described in carbapenem-resistant *P. aeruginosa* isolates, including Imipenemase (IMP), Verona integron-encoded metallo- β -lactamase (VIM) and São Paulo Metallo- β -lactamase (SPM) [11, 12]. In Brazil, SPM is the most frequent mechanism of resistance among carbapenem-resistant *P. aeruginosa*, since the endemic clone harbouring the blaSPM-1 MBL gene, sequence type 277 (ST277), has spread throughout the country [13]. In contrast, the STs described in isolates of *P. aeruginosa* causing outbreaks in hospitals worldwide are ST235, ST111 and ST175 [14].

In order to analyse the mortality and risk factors for developing BSI caused by carbapenem-resistant *P. aeruginosa* (CRPa), we conducted a retrospective case-control study during an outbreak at the bone marrow transplant (BMT) unit of a teaching hospital in São Paulo, Brazil, and the evaluated microbiological and molecular characteristics of the isolates.

METHODS

Setting

The study was conducted at the 12-room BMT unit of Hospital das Clínicas, São Paulo, Brazil, a 1000-bed tertiary-care unit affiliated with the University of São Paulo, from December 2011 to January 2013.

Case and case-control definitions

A case was defined as any patient in the BMT unit with a positive peripheral and/or central line blood culture for CRPa during this period and, for further analysis, the reference date used was the day of the first positive culture. Carbapenem resistance was defined as resistance to imipenem and/or meropenem. A control was defined as any patient that remained in the same unit, during the same period, for a minimum of seven days, with at least one negative surveillance culture for CRPa collected in the final seven days before hospital discharge, and who had not developed any infection due to CRPa during the study period. The reference date used for comparison was the day of the final negative surveillance culture.

Study design and data collection

We conducted a 1:2 case-control study to identify risk factors for CRPa-BSI. Data regarding demographic and clinical characteristics were collected from medical records. The following information was obtained for each patient: age, sex, underlying disease, status of the disease (initial diagnosis, complete remission, partial remission or refractory disease), admission date, time from admission, the reference date, data regarding prior HSCT, type of transplant (i.e. autologous or allogeneic, related and matched) and outcome (i.e. discharge or death). Additional data were collected regarding the 30 days prior to the reference dates for cases, and throughout the in-hospital stay for the controls, addressing the exposure to potential risk factors such as chemotherapy; total body irradiation (TBI); graft-versus-host disease (GVHD) prophylaxis; transplantation conditioning; recently administered

antibiotics (used 30 days before the reference date for cases, and for all admission periods for controls); dosage of corticosteroids (adjusted for milligrams of prednisone); presence and duration of neutropenia (defined as an absolute neutrophil count <500 cells mm^{-3}); and central venous catheter use (type and duration). Clinical data such as the presence and grade of mucositis (I–IV according to the Southwest Oncology Group grading system), presence of GVHD, severity of neutropenia (<100 cells mm^{-3}), MASCC score (Multinational Association for Supportive Care in Cancer), platelet count and creatinine value also were obtained. In addition to these data, information regarding the treatment of cases, such as antibiotic(s) used for the treatment of CRPa-BSI; time of introduction of appropriate antibiotic (polymyxins B or E or aminoglycoside based on susceptibility profile); source of infection (related to central catheter or not); removal of the device if catheter-related bloodstream infection (CRBSI); outcome (e.g. discharge or death); catheter insertion; and transplant until first positive culture for CRPa were collected. The timing of antibiotic was considered correct up to 6 h of positive culture. Also obtained was information from the reference date to death, and whether this was related to the BSI. Non-related death was considered if there was any another cause of death in the autopsy, or if it occurred after the resolution of the CRPa infection described.

Microbiological and molecular analysis

Isolate identification was performed using the automated Vitek system (bioMérieux, Hazelwood, MO).

Antibiotic sensitivity profile

Minimum inhibitory concentrations (MICs) for aminoglycosides, imipenem, meropenem and polymyxins B and E were determined by broth microdilution, according to the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI 2012; <https://clsi.org/>).

Molecular typing

Molecular profiles were assessed by pulsed field gel electrophoresis (PFGE), using SpeI restriction enzyme (Fermentas, USA) in chromosomal DNA Ultrapure Agarose (Invitrogen, Life Technologies). Patterns were interpreted according to Bionumerics version 7.1 (Applied-Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). A Dice coefficient >0.80 was considered the cut-off for potential clonal relatedness.

Carbapenemase genes

PCR for the following carbapenemase genes, bla_{IMP}, bla_{SPM}, bla_{VIM}, bla_{SIM}, bla_{NDM}, bla_{KPC} and bla_{GES}, was performed as described previously [15–17]. The following reference strains were used in this study: *P. aeruginosa* producing IMP-1, VIM-1, SIM-1, SPM-1 enzymes KPC ATCC, *E. coli* NDM. Nucleotide sequencing to confirm the enzyme gene types was performed by MegaBACE 1000. The sequences were analysed using Sequence Analyzer software with Base Caller Cimarron 3.12. The genetic sequence was compared to the database available on the Internet (BLAST-<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Whole-genome sequencing

Whole-genome sequencing (WGS) of the predominant clone of CRPa and two strains belonging to a clone with a different profile of resistance identified during the outbreak in the BMT unit, in São Paulo, Brazil, was performed to investigate the mechanism of resistance, multilocus sequence typing (MLST) and virulence genes. The libraries were prepared with the Nextera XT Illumina™ kit and submitted for WGS by MiSeq Illumina™ methodology. *De novo* assembly of reads was performed using VelvetOptimiser v. 2.2.5 (Victorian Bioinformatics Consortium, Australia), and contigs were ordered by Abacas v. 1.3.1 [18]. The genome annotation was performed by Prokka [19]. The study of resistance and virulence genes was performed using the tools Resfinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) and Blast 2 Seq (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Clonal relatedness was investigated by MLST (<http://pubmlst.org/paeruginosa/>). Subsequently, the results generated by these tools and the presence of the gene were confirmed by manual curation in the program Artemis v. 16.0.0.

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) were identified by mapping the sequencing reads of the isolates against *P. aeruginosa* PAOI (Genbank accession number AE004091.2) using BWA, SAMtools and Genome Analysis Toolkit (GATK). All SNPs were manually checked.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using STATA version 12.1. Unpaired *t*-test was performed for continuous variables, and Chi square or Fisher's exact test for categorical data. A multivariate analysis was assessed with stepwise logistic regression for variables with a *P* value of <0.10 in the bivariate analysis and biological plausibility. A *P* value of <0.05 was considered significant. In our study, to avoid bias, we used two models to perform the multivariate analysis, one with neutropenia, MASCC and use of corticoids, and another without. Establishing a reference date in order to analyse risk factors for infection can easily overestimate clinical characteristics related to severity, as these factors would point to more severe values in the infection group (cases) than in the group without infection (controls). A Kaplan–Meier survival curve was performed to compare treatment with two or three antibiotics.

RESULTS

Outbreak description

In December 2011, an outbreak of CRPa-BSI was identified at the BMT and up to January 2013, 29 patients were diagnosed with positive blood culture for CRPa; 176 HCSTs were performed in our hospital during the study period. When two cases in the same month were detected (in January 2012), the following measures were implemented: surveillance cultures (weekly rectal swab and faeces) from patients admitted to the unit; contact precaution for all cases during hospitalization; central line bundle; reinforcement of the cleaning regimens; and compliance with hand hygiene and contact precaution.

One hundred and twenty-one opportunities for compliance with contact precautions, including hand hygiene, were observed. Compliance with hand hygiene was 71 % among nurses and 79 % among physicians; in regard to wearing a gown the figures were 86 and 84 %, respectively; and for wearing gloves 81 and 84 %, respectively. The BMT unit baseline data on compliance with contact precaution varied from 66 to 70 % prior to the outbreak. In total, 132 samples from environmental (water sources, such as sink and shower; frequently touched equipment such as infusion pumps, stethoscopes and others) and healthcare workers (hand cultures) were collected, and all were negative for *P. aeruginosa*.

Case-control study

Over the study period, 58 patients were selected as controls. It was not possible to include patients with BSI caused by GNBs other than MRSA as controls, because during the outbreak only 11 *K. pneumoniae*, 2 *Enterobacter cloacae*, 2 *Serratia marcescens*, 1 *A. baumannii* and 1 MRSA BSI were identified. Demographic and clinical characteristics are shown in Table 1. Bivariate analysis showed that prior allogeneic transplantation (OR=5, 95 % CI: 1.6–16.8; *P*=0.002) was significantly associated with CRPa-BSI. Long-term catheter (LTC) use was associated with CRPa-BSI (OR=8.08, 95 % CI: 1.08–355; *P*=0.029), but the type of LTC (Permcath, Hickman and Portocath) (*P*=1.0) was not associated with CRPa-BSI. The mean interval between LTC insertion and HSCT and the identification of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* in blood was 51.9±7.8 cases (Table 1).

Regarding the study cases, the average time between admission and first positive culture was 35.1 days, and from the time of culture collection to death was 7.2 days, with 14 cases (58 %) dying in three days or less from the time of blood assessment. Twenty-two of the 29 BSI cases were diagnosed as CRBSI. Twenty-three (79 %) culminated in death, with 19 cases (65 %) being directly associated with BSI; two patients died due to other complications (pulmonary embolism and cerebral hemorrhage), and two from a recurrent CRPa infection (one with pneumonia and the other with another BSI that occurred after the study period). Of all CRBSIs, only 10 had the LTC removed by the end of treatment or death; this strategy had no impact on death (*P*=0.2). Four cases died before the isolation of CRPa in the blood and were treated only with carbapenems. Polymyxin alone was used in one case, polymyxin plus carbapenems in 12 cases and finally, polymyxin plus aminoglycoside plus carbapenem in 12 patients (from 24 patients that used it, nine received polymyxin B and 15 received polymyxin E). However, there was no difference in prognosis regarding the antibiotic treatment used, since the Kaplan–Meier survival curve comparing the use of two and three drugs in treatment showed no impact on outcome (*P*=0.17). Data regarding the timing of antibiotic administration was available for 17 patients; 1/4 of patients that survived and 7/13 of patients that died received antibiotic within 6 h of the availability of microbiology results.

The first model with no severity score showed that neutropenia (OR 33.24; 95 % IC 1.82–607; *P*=0.018), GVHD

Table 1. Bivariate analysis of demographic and clinical variables in case-control study of risk factors for CRPa-BSI in HSCT patients

	Cases (n=29)	Controls (n=58)	OR (95 % IC)	P
Age	38.6±2.6	43.6±1.8	–	
Sex – Male	17 (59 %)	27 (46 %)	1.62 (0.66–4.00)	0.36
Length of hospital stay (days, mean)	35.1±4.9	43.6±1.8	–	0.12
Underlying disease				
Acute leukaemia	10 (34 %)	6 (10 %)	4.5 (1.1–17.2)	0.008
Chronic leukaemia	1 (2 %)	2 (3 %)	1.0 (0.08–11.05)	1.00
Lymphoma	4 (14 %)	22 (38 %)	0.26 (0.08–0.85)	0.016
Aplastic anaemia	5 (17 %)	11 (20 %)	0.89 (0.27–2.8)	0.8
Multiple myeloma	3 (10 %)	6 (10 %)	1.0 (0.23–2.45)	1.0
Others	6 (21 %)	17 (19 %)	0.62 (0.21–1.81)	0.54
Type of HSCT				
Allogeneic HSCT	16 (36 %)	20 (74 %)	5.00 (1.73–14.3)	0.020
Unrelated HSCT	2 (4.5 %)	(18.5 %)	4.72 (0.85–26.6)	0.067
Immunosuppressive drugs and therapy				
Conditioning for HSCT	23 (85 %)	38 (85 %)	(0.64–6.60)	0.89
GVHD Prophylaxis	22 (81 %)	13 (30 %)	10 (2.9–410)	<0.001
TBI	9 (33 %)	3 (7 %)	6.8 (1.4–42)	0.007
Medium corticoid dose, mean	1610±475	810±155	–	0.049
Antibiotic usage				
Previous use of carbapenem	24 (83 %)	19 (33 %)	9.8 (2.9–37)	<0.01
Days of carbapenem usage, mean	6.1±1.1	4.1±0.9	–	0.19
Levofloxacin usage	11 (38 %)	11 (19 %)	2.61 (0.86–7.96)	0.55
Days of levofloxacin usage, mean	4.2±0.6	3.5±0.5	–	0.52
Presence of neutropenia	27 (93 %)	35 (60 %)	8.8 (1.8–82)	0.001
Severe neutropenia (<100 cells)	25	11	31 (7.89–122)	0.029
Permcath	24	39	0.92 (0.23–2.61)	1.00
Hickman	3	5	1.22 (0.27–5.51)	0.80
Portocath	1	1	1.91 (0.11–32.0)	1.00
MASCC score, mean patient neutropenia	16.4±0.7	20.4±0.4	–	0.001
MASCC score >21 patient neutropenia	1 (4 %)	10 (34 %)	0.07 (0.009–0.67)	0.005
Platelet count, mean	25.600±2.700	97.741±13.915	–	0.01
Creatinine level (mean)	1.06±0.13	0.85±0.07	–	0.13
Mucositis	15 (52 %)	9 (17 %)	3.33 (0.77–14.31)	0.006
Grades I–II	6 (26 %)	6 (11 %)	2.26 (0.65–7.76)	0.20
Grades III–IV	9 (45 %)	3 (6 %)	8.25 (2.02–33.5)	0.001
GVHD	5	0	–	0.006

Bold indicates the variables that were significant in bivariate analysis or and in the multivariate model.

prophylaxis (OR 223.36; 95 % IC 2.73–1827.2; $P=0.016$) and prior use of carbapenems (OR 68.73; 95 % IC 3.14–1503.6; $P=0.0089$) were associated with CRPa-BSI; however, when MASCC ≥ 21 points and platelets were included in the final multivariate analysis, only prior use of carbapenems remained as an independent risk factor for CRPa-BSI (OR 22.06; 95 % IC 1.19–44.4; $P=0.043$) (Table 2).

Microbiological data

All isolates were resistant to carbapenems (Imipenem MIC ranged from 16 to 128 and meropenem MIC from 8 to

256 $\mu\text{g ml}^{-1}$) and susceptible to polymyxins B and E (MIC ranged from 0.5 to 1.0 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Twelve isolates were susceptible to aminoglycosides.

Molecular analysis

Sixteen isolates were analysed, seven harbouring the SPM-1 gene, seven co-harbouring both KPC and SPM genes, and in one isolate no carbapenemases were detected. Six of 29 patients were co-infected by carbapenem-resistant Enterobacteria (5 *K. pneumoniae* and 1 *Serratia marscen-cens*), but KPC was detected by PCR in only 1

Table 2. Multivariate analysis of risk factors for CRPa-BSI in HSCT patients

	OR	95 % CI	P
Acute leukaemia	1.17	0.06–21.1	0.91
Lymphoma	0.18	0.01–2.16	0.18
Allogeneic HSCT	0.34	0.03–3.47	0.15
Mucositis III–IV	0.40	0.02–5.51	0.49
TBI	0.98	0.01–49.8	0.68
GVHD prophylaxis	15.19	0.52–440.0	0.11
Neutropenia	6823.5	0.001–1.01	0.49
Platelet count	1.00	0.99–1.00	0.77
MASCC >21 points	0.19	0.01–9.31	0.45
Previous use of carbapenems	22.06	1.19–44.4	0.043

K. pneumoniae strain identified from a patient with KPC-negative *P. aeruginosa* infection. The dendrogram showed that there was a predominant clone in our BMT unit, evidencing probable cross-transmission (Fig. 1). In total, three strains were sequenced, a representative of the predominant clone (strain 963) and two strains that belonged to another clone, 1266 (SPM-1 positive) and 1315 (carbapenemase negative). Strains 1266 and 1315 were chosen because they belong to the same clone but differ in their carbapenemase profile. The three strains sequenced were assigned as ST277, harbouring Tn4371 and several genes with resistance to aminoglycosides, beta-lactam agents, fluoroquinolone, phenicol and sulfonamide (Tables 3 and 4), and did not differ regarding either outer membrane protein, or efflux pumps. Virulence genes involved in adhesion, biofilm, quorum sensing and type III secretion systems were identified, but *exoU* was not present in the three strains sequenced (Table 3).

DISCUSSION

This is the first report of an outbreak due to *P. aeruginosa* harbouring *bla*_{KPC} and co-harbouring both *bla*_{KPC} and *bla*_{SPM} genes in HSCT patients. Our findings showed that prior carbapenem use was the only independent factor associated with CRPa-BSI and that combination therapy with two or three antibiotics had no impact on mortality. The overall mortality among our cases was very high (79 %), but similar to prior reports showing that mortality from BSI caused by *P. aeruginosa* in HSCT patients ranged from 40 to 87.5 % [5, 20]. Interestingly, the carbapenem-resistant *P. aeruginosa* in our study harboured different carbapenemases and two carbapenemase genes. Nonetheless, the predominant clone harboured SPM-1 gene and belonged to ST277, and four strains co-harboured KPC. One previous study showed that SPM was the most frequent carbapenemase identified in the BMT unit at our hospital, followed by KPC-2 [21]. KPC in *P. aeruginosa* is rare and occurs mainly on the American continent

Fig. 1. Dendrogram of 17 carbapenem-resistant *P. aeruginosa* strains isolated from bloodstream infection in HSCT patients

Table 3. Whole-genome sequencing of predominant clone of *P. aeruginosa* harbouring SMP identified in a bone marrow unit in São Paulo, Brazil

Laboratory number	Isolation site	Resistance profile MIC ($\mu\text{g ml}^{-1}$)				Whole-genome sequence analysis					
		AK	MER	COL	Tn4371	Resistance genes	Quorum sensing	Biofilm	Adhesion	Cytotoxicity and invasion process SST III	ST
Predominant Clone Strain 963 2012	Blood	8	512	0.5	Present	aph(3')-Ib, aadA7, aacA4, bla _{SPM-1} , bla _{PAO} , bla _{OXA-56} , bla _{OXA-50} , aac(6')Ib-cr, fosA, catB7, cmx, sul1	bfmR-S, qscR, qteE	gacA, gacS, ladS, lasB	csuD lecB	exoS, exoY	277
Strain 1266 2012	Blood	512	256	0.5	Present	aph(3')-Ib, aadA7, rmtD, aacA4, bla _{PAO} , bla _{OXA-56} , bla _{OXA-50} , aac(6')Ib-cr, fosA, catB7, cmx, sul1	bfmR-S, qscR, qteE	gacA, gacS, ladS, lasB	csuD lecB	exoS, exoY	277
Strain 1315 2012	Blood	512	512	1	Present	aph(3')-Ib, aadA7, rmtD, aacA4, bla _{SPM-1} , bla _{PAO} , bla _{OXA-56} , bla _{OXA-50} , aac(6')Ib-cr, fosA, catB7, cmx, sul1	bfmR-S, qscR, qteE	gacA, gacS, ladS, lasB	csuD lecB	exoS, exoY	277

AK, amikacin; MER, meropenem; COL, colistin; MIC, minimal inhibitory concentration; ST, sequence type. Tn4371 – transposon. *aacA4* – aminoglycoside *N*(6')-acetyltransferase type 1; *aac(6')Ib-cr* – aminoglycoside 6'-*N*-acetyltransferase Ib-Cr type; *aadA7* – streptomycin 3''-adenylyltransferase; *aadA10* – streptomycin 3''-adenylyltransferase; *aph(3')-Ib* – aminoglycoside-phosphotransferase; *blaOXA-50* – oxacillinase; *blaOXA-56* – oxacillinase; *blaPAO* – beta-lactamase; *blaSPM-1* – beta-lactamase; *blaVIM-36* – beta-lactamase; *catB7* – chloramphenicol acetyltransferase; *cmx* – chloramphenicol resistance protein; *fosA* – glutathione transferase; *rmtD* – 16S rRNA methylase; *sul1* – sulfonamide-resistant dihydropteroate synthase; *gacA* – response regulator; *gacS* – sensor protein; *ladS* – lost adherence sensor; *lasA* – protease *lasB* – elastase; *plcB* – phospholipase C; *plcH* – haemolytic phospholipase C; *plcN* – non-haemolytic phospholipase C; *plcR* – phospholipase accessory protein; *qscR* – quorum-sensing control repressor; *qteE* – quorum threshold expression element; *bfmR* – response regulator; *bfmS* – sensor kinase; *lecB* – fucose-binding lectin PA-III; *exoT* – exoenzyme T; *exoY* – adenylate cyclase; *exoU* – phospholipase protein; *toxA* – exotoxin A.

[22–25]. Moreover, *P. aeruginosa* harbouring KPC was described recently in Iran, showing the potentially rapid dissemination of this resistance mechanism around the world [26]. Association between colonization and infection by KPC-positive Enterobacteria and the spread of KPC among *P. aeruginosa* has been described [27]. One previous study [27] observed that 43 % of *Pseudomonas* isolates obtained after an outbreak of KPC-producing *K. pneumoniae* harboured the blaKPC gene. In our study, although

co-infection by carbapenem-resistant Enterobacteria occurred in six patients, only one *K. pneumoniae* strain harboured KPC. This strain was identified from a patient with a KPC-negative *P. aeruginosa* infection.

The predominant clone identified in our hospital harboured several resistance genes, such as 16S rRNA methyltransferase gene *rmtD1*, which confers high-level resistance to all aminoglycosides and has been associated with ST277. It also

Table 4. Outer membrane protein and efflux pump gene mutations by whole-genome sequencing of 3 carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains

Isolate	OprD	OprE	OprM	MexD	OprJ	MexE	MexI	OpmD	MexT
Predominant Clone 963	T103S , K115T , V118P, F170L	S213G, T377G, V378L, V380L, I388M, S391K, K394N, T397S, A398G, S410A, S434T, A438V, A439S, S443T, N444A, N445T, S441_S442insG, L106_D107_insGL	A261T	E257Q, S845A	D68G, M69V	P397Q, A407V	A782E	L381R	F94I, I263F, D267E
1266*	T103S , K115T , V118P, F170L	S213G, T377G, V378L, V380L, I388M, S391K, K394N, T397S, A398G, S410A, S434T, A438V, A439S, S443T, N444A, N445T, S441_S442insG, L106_D107_insGL	A261T	E257Q, S845A	D68G, M69V	P397Q, A407V	A782E	L381R	F94I, I263F, D267E
1315	T103S , K115T , V118P, F170L	S213G, T377G, V378L, V380L, I388M, S391K, K394N, T397S, A398G, S410A, S434T, A438V, A439S, S443T, N444A, N445T, S441_S442insG, L106_D107_insGL	A261T	E257Q, S845A	D68G, M69V	P397Q, A407V	A782E	L381R	F94I, I263F, D267E

Bold indicates the OprD mutations already described in CRPa related to carbapenems-resistance.

*Strain 1266: SPM gene negative.

Porins – OprC, OprD, OprF, OprF; Efflux pump genes: MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexGHI-OpmD; MexR – repressor of operon MexAB-OprM; and MexT – post-transcriptional activator MexEF-OprN. Mutations T103S, K117T and F170L already described in CRPa, associated with carbapenem-resistance due to porin alterations.

carried other resistance genes for phenicol, fluoroquinolone and the carbapenemases SPM-1 and Tn4371. ST277 was recently reported in the UK from a patient who underwent surgery during travel to Brazil [28]. The authors demonstrated that the SPM-1 was located in Tn4371, flagging up the potential of spread of this lineage throughout the world. In this context, the dissemination of SPM is worthy of concern. An intriguing finding in our study is that the clone assigned as ST277 did not harbour carbapenemase and presented mutation of an outer membrane protein, which explains its resistance to carbapenems. The three strains analysed by WGS did not differ regarding virulence and mutations in OMP, efflux pump and PBP. Mutations in OprD and efflux pump could, alternatively, explain carbapenem resistance in the strain that did not harbour carbapenemase. The mutations T103S, K115T and F170L were found in the three strains analysed by WGS. These mutations have already been described in CRPa, associated with carbapenem resistance due to porin alterations [29–33]. The mutation V118P was found in all three strains, but as it has not yet been described as being associated with carbapenem resistance, further studies are required to verify its role in resistance.

The ST277 clone harboured important virulent genes involved in adhesion, quorum sensing, biofilm production and the type III secretion system [14], which explains the persistence of this clone over one year and the difficulty in controlling the outbreak. On the other hand, an important virulence gene, *exoU*, was not identified in any of the three strains sequenced. A recent study showed a similar result, demonstrating that among high-risk MDR clones ST111, ST235 and ST175, *exoU* was observed only in the epidemic clone ST235 [34].

P. aeruginosa is the second most prevalent pathogen among all infections related to nosocomial outbreaks, and a frequent cause of infection among HSCT patients [35]. Outbreaks due to *P. aeruginosa* are mostly related to environmental contamination, cross-transmission, medical equipment and water source [36, 37]. However, in 2011, Vonberg *et al.* [35], showed that in 39.7% of reports no environmental source was identified and almost half (47.5%) were linked to cross-transmission. As soon as an outbreak was identified, molecular analysis showed that there was a predominant clone, evidencing cross-transmission. Thus, surveillance cultures of patients, staff and the environment were performed, but despite extensive investigation, no environmental source was identified. The outbreak was controlled after one year of reinforcement of all infection control measures such as hand hygiene, environmental cleaning, contact precaution and CVC care.

In our study, in order to avoid bias, we used two models to perform the multivariate analysis, with and without all the clinical factors described above. The model without a severity score showed that neutropenia ($P=0.018$), GVHD prophylaxis ($P=0.016$) and prior use of carbapenems

($P=0.0089$) were associated with CRPa-BSI. However, when MASCC ≥ 21 points and platelets were included in the final multivariate analysis, only prior use of carbapenems remained as an independent risk factor for CRPa-BSI ($P=0.043$).

A possible explanation for the observed high mortality is the low number of antibiotics available to treat MDR bacteria, especially carbapenem-resistant *P. aeruginosa*. In this scenario, combined therapy has been used as an option to treat MDR pathogens [38–40]. All the cases described here received carbapenems in combination with polymyxins, and some also received aminoglycoside. Combination therapy with two or three drugs, however, did not have any impact on outcome, probably because of the size of population analysed.

An important limitation of our study is that we did not address the expression of the phenotypic characteristics of virulence genes. Thus, we cannot infer the role of virulence of the predominant clone on mortality. The controls used in our study represent another important limitation. Because of the scarcity infections caused by other bacteria during the outbreak and the number of patients submitted for HSCT, it was not possible to include BSIs caused by GNB other than MRSA as controls.

In conclusion, CRPa-BSI harbouring SPM-1 in HSCT patients resulted in high mortality, and combination therapy with two or three drugs did not have any impact on outcomes. The predominant clone producing SPM-1 belonged to ST277 and harboured Tn 4371. Prior exposure to carbapenems was the only independent risk factor associated with CRPa-BSI, and showed that the rational use of carbapenems in this setting should be reconsidered.

Funding information

The authors received no specific grant from any funding agency.

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Ethical statement

These experiments were approved by the Ethical Committee of Hospital das Clinicas of University of Sao Paulo, Brazil.

References

1. Cappellano P, Viscoli C, Bruzzi P, van Lint MT, Pereira CA *et al.* Epidemiology and risk factors for bloodstream infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *New Microbiol* 2007;30:89–99.
2. Mikulska M, del Bono V, Raiola AM, Bruno B, Gualandi F *et al.* Blood stream infections in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients: reemergence of Gram-negative rods and increasing antibiotic resistance. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009;15:47–53.
3. Ortega M, Rovira M, Almela M, Marco F, de La Bellacasa JP *et al.* Bacterial and fungal bloodstream isolates from 796 hematopoietic stem cell transplant recipients between 1991 and 2000. *Ann Hematol* 2005;84:40–46.
4. Hakki M, Limaye AP, Kim HW, Kirby KA, Corey L *et al.* Invasive *Pseudomonas aeruginosa* infections: high rate of recurrence and mortality after hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2007;39:687–693.

5. Paez J, Levin AS, Fu L, Basso M, Fonseca GH *et al.* Clusters of infection due to metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in stem cell transplant and haematology units. *J Hosp Infect* 2011;77:76–77.
6. Mikulska M, del Bono V, Bruzzi P, Raiola AM, Gualandi F *et al.* Mortality after bloodstream infections in allogeneic haematopoietic stem cell transplant (HSCT) recipients. *Infection* 2012;40:271–278.
7. Veessenmeyer JL, Hauser AR, Lisboa T, Rello J. *Pseudomonas aeruginosa* virulence and therapy: evolving translational strategies. *Crit Care Med* 2009;37:1777–1786.
8. El-Solh AA, Hattemer A, Hauser AR, Alhajhusain A, Vora H. Clinical outcomes of type III *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. *Crit Care Med* 2012;40:1157–1163.
9. Peña C, Cabot G, Gómez-Zorrilla S, Zamorano L, Ocampo-Sosa A *et al.* Influence of virulence genotype and resistance profile in the mortality of *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. *Clin Infect Dis* 2015;60:539–548.
10. Varga JJ, Barbier M, Mulet X, Bielecki P, Bartell JA *et al.* Genotypic and phenotypic analyses of a *Pseudomonas aeruginosa* chronic bronchiectasis isolate reveal differences from cystic fibrosis and laboratory strains. *BMC Genomics* 2015;16:883.
11. Hong DJ, Bae IK, Jang I-H, Jeong SH, Kang H-K *et al.* Epidemiology and characteristics of metallo- β -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Chemother* 2015;47:81–97.
12. Yong D, Toleman MA, Bell J, Ritchie B, Pratt R *et al.* Genetic and biochemical characterization of an acquired subgroup B3 metallo- β -lactamase gene, bla_{AIM-1}, and its unique genetic context in *Pseudomonas aeruginosa* from Australia. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:6154–6159.
13. Silva FM, Carmo MS, Silbert S, Gales AC. SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa*: analysis of the ancestor relationship using multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and automated ribotyping. *Microb Drug Resist* 2011;17:215–220.
14. Ledizet M, Murray TS, Puttagunta S, Slade MD, Quagliarello VJ *et al.* The ability of virulence factor expression by *Pseudomonas aeruginosa* to predict clinical disease in hospitalized patients. *PLoS One* 2012;7:e49578.
15. Bradford PA, Urban C, Visalli M, Mariano N, Landman D *et al.* Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenem hydrolyzing KPC-2 and Inhibitor-resistant TEM30 β -lactamases in New York. *Clin Infect Dis* 2004;1:55–60.
16. Mendes ER, Monteiro J, Castanheira M, Andrade SS, Gales AC *et al.* Rapid detection and identification of Metallo- β -lactamase-encoding genes by multiplex real time PCR assay and melt curve analysis. *J Clin Microbiol* 2007;2:544–547.
17. Chen Y, Zhou Z, Jiang Y, Yu Y. Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in China. *J Antimicrob Chemother* 2011;66:1255–1259.
18. Assefa S, Keane TM, Otto TD, Newbold C, Berriman M. ABACAS: algorithm-based automatic contiguation of assembled sequences. *Bioinformatics* 2009;25:1968–1969.
19. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 2014;30:2068–2069.
20. Caselli D, Cesaro S, Ziino O, Zanazzo G, Manicone R. *et al.* Multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection in children undergoing chemotherapy and hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica* 2010;95:1612–1615.
21. Rizek C, Fu L, dos Santos LC, Leite G, Ramos J *et al.* Characterization of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates, carrying multiple genes coding for this antibiotic resistance. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2014;13:43.
22. Villegas MV, Lolans K, Correa A, Kattan JN, Lopez JA. *et al.* First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:1553–1555.
23. Poirel L, Nordmann P, Lagrutta E, Cleary T, Munoz-Price LS. Emergence of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:3072.
24. Pasteran F, Faccione D, Gomez S, De Bunder S, Spinelli F *et al.* Detection of an international multiresistant clone belonging to sequence type 654 involved in the dissemination of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Argentina. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:1291–1293.
25. Jácome PR, Alves LR, Cabral AB, Lopes AC, Maciel MA. First report of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:4990.
26. Lari AR, Azimi L, Rahbar M, Alaghebandan R, Sattarzadeh-Tabrizi M. First report of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in Iran: phenotypic and genotypic methods. *GMS Hyg Infect Control* 2014;9:Doc06.
27. Ramirez DG, Nicola F, Zarate S, Rellosio S, Smayevsky J *et al.* Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* with KPC-type carbapenemase in a teaching hospital: an 8-year study. *J Med Microbiol* 2013;62:1565–1570.
28. Hopkins KL, Findlay J, Mustafa N, Pike R, Parsons H *et al.* SPM-1 metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST277 in the UK. *J Med Microbiol* 2016;65:696–697.
29. Richardot C, Juarez P, Jeannot K, Patry I, Plésiat P *et al.* Amino acid substitutions account for most MexS alterations in clinical *nfxC* mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2016;60:2302–2310.
30. Rojo-Bezares B, Cavalié L, Dubois D, Oswald E, Torres C *et al.* Characterization of carbapenem resistance mechanisms and integrons in *Pseudomonas aeruginosa* strains from blood samples in a French hospital. *J Med Microbiol* 2016;65:311–319.
31. Sun Q, Ba Z, Wu G, Wang W, Lin S *et al.* Insertion sequence ISRP10 inactivation of the *oprD* gene in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Int J Antimicrob Agents* 2016;47:375–379.
32. Kao CY, Chen SS, Hung KH, Wu HM, Hsueh PR *et al.* Overproduction of active efflux pump and variations of *OprD* dominate in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with bloodstream infections in Taiwan. *BMC Microbiol* 2016;16:107.
33. Kim CH, Kang HY, Kim BR, Jeon H, Lee YC *et al.* Mutational inactivation of *OprD* in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Korean hospitals. *J Microbiol* 2016;54:44–49.
34. Gómez-Zorrilla S, Juan C, Cabot G, Camoez M, Tubau F *et al.* Impact of multidrug resistance on the pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa*: *in vitro* and *in vivo* studies. *Int J Antimicrob Agents* 2016;47:368–374.
35. Vonberg R-P, Weitzel-Kage D, Behnke M, Gastmeier P. Worldwide Outbreak Database: the largest collection of nosocomial outbreaks. *Infection* 2011;39:29–34.
36. Nagao M, Iinuma Y, Igawa J, Saito T, Yamashita K *et al.* Control of an outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a haemato-oncology unit. *J Hosp Infect* 2011;79:49–53.
37. Fanci R, Bartolozzi B, Sergi S, Casalone E, Pecile P *et al.* Molecular epidemiological investigation of an outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infection in an SCT unit. *Bone Marrow Transplant* 2009;43:335–338.
38. Bassetti M, Righi E, Viscoli C. *Pseudomonas aeruginosa* serious infections: mono or combination antimicrobial therapy? *Current medicinal Chemistry* 2008;15:517–522.
39. Hawser SP. Superior activity of colistin against *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates, including multidrug-resistant isolates, from multiple infection sources from 2007 to 2009. *Int J Antimicrob Agents* 2011;37:587.
40. Hachem RY, Chemaly RF, Ahmar CA, Jiang Y, Boktour MR *et al.* Colistin is effective in treatment of infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in cancer patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:1905–1911.