



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

TESE DE DOUTORADO

Paula Regina Luna de Araújo Jácome

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO E MOLECULAR DE INFECÇÕES OCASIONADAS
POR *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* spp. E *Acinetobacter* spp. EM PACIENTES
COM NEOPLASIAS SÓLIDAS, INTERNADOS EM UM HOSPITAL DE RECIFE-PE**

Orientadora: Prof. Dra. Maria Amélia Vieira Maciel

Co-orientadora: Prof. Dra. Ana Catarina de Souza Lopes

RECIFE

2015

PAULA REGINA LUNA DE ARAÚJO JÁCOME

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO E MOLECULAR DE INFECÇÕES OCASIONADAS
POR *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* spp. E *Acinetobacter* spp. EM PACIENTES
COM NEOPLASIAS SÓLIDAS, INTERNADOS EM UM HOSPITAL DE RECIFE-PE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Departamento de Medicina Tropical, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, como um dos requisitos para obtenção do título de doutora em Medicina Tropical.

Orientadora: Prof. Dra. Maria Amélia Vieira Maciel

Co-orientadora: Prof. Dra. Ana Catarina de Souza Lopes

RECIFE

2015

Catálogo na Publicação (CIP)
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

- J17e Jácome, Paula Regina Luna de Araújo.
Estudo epidemiológico e molecular de infecções ocasionadas por *pseudomonas aeruginosa*, *klebsiella* spp. e *acinetobacter* spp. em pacientes com neoplasias sólidas, internados em um hospital de Recife-PE / Paula Regina Luna de Araújo Jácome. – 2015.
169 f.: il. tab.; quad.; 30 cm.
- Orientadora: Maria Amélia Vieira Maciel.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Recife, 2015.
Inclui referências, apêndices e anexos.
1. Beta-Lactamases. 2. *Pseudomonas aeruginosa*. 3. *Acinetobacter* spp.
4. *Klebsiella* spp. 5. Neoplasia. I. Maciel, Maria Amélia Vieira (Orientadora).
II. Título.

618.9883

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2016-070)

**ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
TROPICAL DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO, NO DIA
16 DE DEZEMBRO DE 2015.**

Aos 16 (dezesesseis) dias do mês de dezembro de dois mil e quinze, às 08:30 horas, na Sala de Aula do PPGMEDTROP- Bl. A, Térreo do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC/UFPE), em sessão pública, teve início a defesa da Tese intitulada “ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO E MOLECULAR DE INFECÇÕES OCASIONADAS POR *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* spp. E *Acinetobacter* spp. EM PACIENTES COM NEOPLASIAS SÓLIDAS, INTERNADOS EM UM HOSPITAL DE RECIFE-PE” da aluna Paula Regina Luna de Araújo Jácome, na área de concentração Medicina Tropical, sob a orientação da Profa. Dra. Maria Amélia Vieira Maciel e coorientação da Profa. Dra. Ana Catarina de Souza Lopes. A doutoranda cumpriu todos os demais requisitos regimentais para a obtenção do grau de DOUTORA em Medicina Tropical. A Banca Examinadora foi indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical, na sua Reunião ordinária e homologada pela Diretoria de Pós-Graduação, através do Processo Nº 23076.050483/2015-08 em 07/12/2015, composta pelos Professores: Vera Magalhães da Silveira, do Departamento de Medicina Tropical da UFPE; Márcia Maria Camargo de Moraes, do Departamento de Patologia da UPE; Maria Betânia Melo de Oliveira, do Departamento de Bioquímica da UFPE; Tereza Cristina Leal Balbino, do Departamento de Microbiologia do CPqAM/FIOCRUZ e Maria Amélia Vieira Maciel, do Departamento de Medicina Tropical da UFPE. Após cumpridas as formalidades, a candidata foi convidada a discorrer sobre o conteúdo da Tese. Concluída a explanação, a candidata foi arguida pela Banca Examinadora que, em seguida, reuniu-se para deliberar e conceder à mesma a menção (Aprovado/Reprovado/Em exigência) APROVADA. E, para constar, lavrei a presente Ata que vai por mim assinada, Secretário(a) de Pós-Graduação, e pelos membros da Banca Examinadora.

Recife, 16 de dezembro de 2015.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

REITOR

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Ermani Rodrigues de Carvalho Neto

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Nicodemos Teles Pontes Filho

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINA TROPICAL**

Valdênia Maria Oliveira de Souza

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINA TROPICAL**

Vera Magalhães da Silveira

CORPO DOCENTE

Ana Catarina de Souza Lopes

Ana Lúcia Coutinho Domingues

Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

Fábio André Brayner dos Santos

Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Maria Amélia Vieira Maciel

Maria de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque

Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

Marli Tenório Cordeiro

Rejane Pereira Neves

Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Valdênia Maria Oliveira de Souza

Vera Magalhães da Silveira

Vlaudia Maria Assis Costa

Dedico esta tese aos meus pais, Edna Luna e Francisco Lustosa, pelo amor e exemplo de vida que me foi dado e aos meus queridos esposo e filho, Agenor Jácome e Arthur Jácome, pelo amor, força e apoio incondicional, por serem o esteio desta caminhada.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelo sustento e por sua infinita bondade derramada em minha vida;

Aos meus pais Francisco Lustosa e Edna Luna, pela dedicação e incentivo em toda a trajetória de minha vida;

Ao meu esposo Agenor Jácome, por estar ao meu lado em todo tempo, apoiando, incentivando e suportando em amor os momentos mais atribulados;

Ao meu filho Arthur Jácome, por ser um presente precioso, que me estimula a querer ser sempre melhor;

A minha orientadora Prof. Dra. Maria Amélia Vieira Maciel, pelo suporte e orientação que me foram prestados;

A minha co-orientadora Prof. Dra. Ana Catarina de Souza Lopes e ao Prof. colaborador Dr. Paulo Sérgio Ramos Araújo, pelo apoio prestado tanto na execução do trabalho, como na revisão dos produtos gerados.

Aos funcionários do CIAC, em especial a Dra. Jesuíta e a técnica de laboratório Fernanda, pela presteza e colaboração no isolamento e identificação dos microrganismos incluídos nesta pesquisa;

Aos funcionários do HCP, em especial a Cândida Nascimento, pelo suporte prestado na coleta de dados, bem como ela amizade que brotou neste processo;

Aos amigos do laboratório Marcelle Aquino, Armando Monteiro, Jailton Lobo, Jussyêgles Pereira, Stephanie Targino, Alessandra Lima e Rita Andrade pelos momentos vividos e crescimento, e em especial a Lílian Rodrigues Alves e Adriane Borges Cabral, pelo suporte companheirismo e dedicação, serei eternamente grata;

Aos amigos do doutorado Natália Morais, Thacianna Barreto, Iana Rafaela Pinheiro, Glaydes Lima, Kledoaldo Lima, Carollina Araújo, Georgge Gomes, Luciana Holmes, Ana Lúcia Fontenele e Ana Paula pelos momentos de aprendizado e pelos momentos divertidos que passamos juntos durante as disciplinas;

Às amigas do trabalho, Juliana Costa, Monik Duarte e Isabela Maciel, pela oportunidade de exercer a epidemiologia e por serem pessoas tão especiais, generosas e dinâmicas;

Aos professores e funcionários do Departamento de Medicina Tropical da UFPE, pelos ensinamentos e contribuições na minha formação;

Ao CNPq, pelo suporte financeiro e a todos que direta ou indiretamente me ajudaram a realizar este trabalho.

RESUMO

Pseudomonas aeruginosa, *Klebsiella* spp. e *Acinetobacter* spp. estão entre as cinco principais causas de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), e estão associadas a um elevado índice de mortalidade em pacientes oncológicos. Diante da vulnerabilidade destes pacientes e da crescente incidência de patógenos multidroga resistentes (MDR), o presente trabalho teve por objetivo realizar um estudo epidemiológico e molecular de infecções ocasionadas por *P. aeruginosa*, *Klebsiella* spp. e *Acinetobacter* spp. em pacientes com neoplasias sólidas, internados em um hospital de Recife-PE. Para tal, foi realizado um estudo descritivo de corte transversal dos dados clínicos, microbiológicos e hospitalares e os genes de resistência *bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M}, foram investigados por meio da reação em cadeia da polimerase. Também foi realizada tipagem molecular dos isolados MDR utilizando a técnica Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-based PCR (ERIC-PCR). Entre 2012 e 2014, foram obtidos 169 isolados, sendo 58 *P. aeruginosa*, 36 *Acinetobacter* spp. e 75 *Klebsiella* spp.. A frequência de patógenos MDR (69,6%, IC_{95%} 61,5% - 76,9%) foi significativamente maior que os isolados não MDR (30,4%, IC_{95%} 23,1% - 38,5%). Dentre as bactérias resistentes aos carbapenêmicos, o gene *bla*_{SPM-1} foi detectado em *P. aeruginosa* (35,5%) e *Acinetobacter* spp. (3,8%), e o gene *bla*_{KPC} detectado apenas em *P. aeruginosa* (25,8%). Já entre os isolados resistentes às cefalosporinas de terceira e quarta geração, o gene *bla*_{TEM} estava presente em *Acinetobacter* spp. (25,9%) e *Klebsiella* spp. (30,6%) e o gene *bla*_{CTX-M} em 58,3% das *Klebsiella* spp.. Também foi observado que o câncer de pulmão e os pacientes do sexo masculino foram predominantes na amostra e que o uso prévio de antimicrobianos durante o internamento e até três meses antes do isolamento do patógeno descrito neste estudo, apresentaram associação com o desenvolvimento de infecções por patógenos MDR. Assim, os resultados encontrados podem contribuir com epidemiologia molecular dos genes de resistência presentes no ambiente hospitalar, além de ressaltar a importância da monitorização contínua das IRAS em pacientes com câncer internados por longos períodos, a fim de melhorar os cuidados prestados a estes pacientes.

Palavras-chave: Beta-Lactamases, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *Klebsiella* spp., Neoplasia.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa, *Klebsiella spp.* and *Acinetobacter spp.* are among the five leading causes of Healthcare-associated Infections (HAI) in cancer patients, and those associated with a high mortality rate. Because of the vulnerability of patients and the increasing incidence of multidrug-resistant pathogens (MDR), this study aimed to realize an epidemiological and molecular study of infections caused by *P. aeruginosa*, *Klebsiella spp.* and *Acinetobacter spp.* in patients with solid tumors, admitted to a Recife-PE hospital. Therefore, we conducted a descriptive cross-sectional study of clinical, microbiological and hospital, and the resistance genes *bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{TEM} and *bla*_{CTX-M}, were investigated by polymerase chain reaction. It was also performed molecular typing of MDR isolates using Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-based PCR (ERIC-PCR). Between 2012 and 2014, were obtained 169 isolates, 58 *P. aeruginosa*, 36 *Acinetobacter spp.* and 75 *Klebsiella spp.*. The frequency of MDR pathogens (69.6% 95% 61.5% - 76.9%) was significantly higher than non-MDR isolates (30.4% 95% 23.1% - 38.5%). Among the carbapenem-resistant bacteria, the *bla*_{SPM-1} gene was detected in *P. aeruginosa* (35.5%) and *Acinetobacter spp.* (3.8%), and *bla*_{KPC} gene detected only in *P. aeruginosa* (25.8%). Among the resistant isolates to the third and fourth generation cephalosporins, the *bla*_{TEM} gene was present in *Acinetobacter spp.* (25.9%) and *Klebsiella spp.* (30.6%) and *bla*_{CTX-M} gene in 58.3% of the *Klebsiella spp.*. It was also noted that lung cancer and male patients were predominant in the sample and the previous use of antimicrobials during hospitalization and antibiotic use up to three months before the pathogen isolation described in this study were associated with the development of pathogen infections MDR. Thus, the results can contribute to molecular epidemiology of resistance genes present in the hospital, and underline the importance of continuous monitoring of HAI in cancer patients hospitalized for long periods aiming improve the care provided to these patients.

Keywords: Beta-Lactamases, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*, cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sítios de ação e possíveis mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos.	29
Figura 2. Representação esquemática da técnica de extração de DNA utilizando o Kit de Extração Brazol	53
Figura1. Dendrograma obtido com base na análise da ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-Polymerase Chain Reaction) dos isolados multirresistentes. (a) <i>P. aeruginosa</i> ; (b) <i>Klebsiella</i> spp.; (c) <i>Acinetobacter</i> spp..	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Esquema de classificação funcional e molecular das β -lactamases.....	31
Tabela 2. Descrição das subclasses de MBL segundo espécie bacteriana, local e ano do primeiro isolamento.....	38
Tabela 3. Relação dos primers e temperatura de anelamento para a pesquisa de genes de MBL	56
Tabela 4. Relação dos primers e temperatura de anelamento para a pesquisa de genes <i>bla</i> _{TEM} e <i>bla</i> _{CTX-M}	58
Tabela 1. Concentração inibitória mínima (CIM) do <i>Acinetobacter baumannii</i> portador do gene <i>bla</i> _{SPM-1}	64
Tabela 2. Caracterização dos isolados clínicos quanto ao tipo de amostra e local de internamento durante o isolamento do patógeno e tipo de neoplasia sólida do paciente.	75
Tabela 3. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos nos isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> spp. e <i>Klebsiella</i> spp.....	77
Tabela 4. Distribuição dos genes β -lactamase por patógenos bacterianos.....	78
Tabela 1. Características dos isolados bacterianos provenientes de infecções relacionadas à saúde em pacientes com neoplasias sólidas quanto ao tipo de bactéria, padrão de resistência e sítio do material coletado.....	99
Tabela 2. Características clínicas e epidemiológicas de infecções relacionadas à saúde em pacientes com neoplasias sólidas.....	100
Tabela 3. Características relacionadas à hospitalização e ao tratamento das infecções relacionadas à saúde em pacientes com neoplasias sólidas.....	102
Tabela 4. Distribuição do uso de antimicrobianos ao longo do período analisado.	105
Tabela 5. Análise univariada dos dados clínicos e epidemiológicos de infecções relacionadas à saúde em pacientes com neoplasias sólidas segundo padrão de resistência.....	106

LISTA DE ABREVIATURAS

AIM-1 – Australian imipenemase

BGNRC - Bactérias Gram-negativas resistentes aos carbapenêmicos

bla – Genes que codificam β -lactamases

BHI - Brain Heart Infusion / Infusão de cérebro e coração

CAAE – Certificado de Apresentação para Apreciação Ética

CDC – Centers for Disease Control and Prevention / Centro de Controle e Prevenção de Doenças

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute / Instituto de Normas Clínicas e Laboratoriais

DIM-1 – Dutch imipenemase

DNA – Deoxyribonucleic Acid / Ácido Desoxiribonucleico

ERIC-PCR – Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-based PCR / Sequências Consensuais Intergênicas Repetitivas de Enterobacterias baseada em PCR

ESBL – Extended-Spectrum β -Lactamases / β -lactamase de Espectro Estendido

FIM-1 – Florence imipenemase

GIM-1 – German imipenemase

IC_{95%} - Intervalo de confiança de 95%

IMP-1 –Imipenemase

INCA – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva

IRAS – Infecções Relacionadas à Assistência a Saúde

KHM-1 – Kyorin Hospital metalo- β -lactamase

KPC – *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase

LPS – Lipopolissacarídeos

MBL – Metallo- β -lactamases

MDR – Multidroga Resistentes

MLST – Multilocus-Sequence Typing / Tipagem de Sequência Multilocus

NDM-1 – New Delhi metallo- β lactamase

pb – Pares de Base

PCR – Polymerase chain reaction / Reação em Cadeia da Polimerase

PFGE – Pulsed-Field Gel Electrophoresis / Eletroforese em gel de campo pulsado

RAPD – Random-Amplified Polymorphic DNA / Polimorfismo do DNA Amplificado

Aleatoriamente

REP-PCR – Repetitive Element-Based PCR / PCR Baseada em Elementos de Repetição

RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism / Polimorfismo no Tamanho dos Fragmentos de Restrição

RR – Risco Relativo

SIH – Sistema de Informações Hospitalares

SIM-1 – Seoul imipenemase

SMB-1 – *Serratia* metallo- β -lactamase

SPM-1 – São Paulo metallo- β -lactamase

SUS – Sistema Único de Saúde

TMB-1 – Tripoli metallo- β -lactamase

UFPE – Universidade Federal de Pernambuco

UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

UTIP – Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica

VIM-1 – Verona imipenemase

SUMÁRIO

1. Introdução	16
2. Revisão de Literatura	18
2.1 INFECÇÕES RELACIONADAS À SAÚDE EM PACIENTES COM CâNCER	18
2.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23
2.3 <i>Acinetobacter</i> spp.....	24
2.4 <i>Klebsiella</i> spp.....	26
2.5 RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS	28
2.2.1 β -LACTAMASES	29
2.2.1.1 β -LACTAMASES DO TIPO KPC	32
2.2.1.2 β -LACTAMASES DO TIPO TEM	33
2.2.1.3 β -LACTAMASES DO TIPO CTX-M.....	35
2.2.1.4 METALO- β -LACTAMASES	36
2.2.1.5 OUTRAS ENZIMAS β -LACTAMASES.....	39
2.6 PESQUISA DE GENES DE RESISTÊNCIA AOS β -LACTÂMICOS EM PACIENTES COM CâNCER	40
2.7 TIPAGEM BACTERIANA.....	41
3. Objetivos.....	44
3.1 OBJETIVO GERAL	44
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
4. Metodologia.....	45
4.1 DESENHO DO ESTUDO	45
4.2. LOCAL DO ESTUDO	45
4.3. POPULAÇÃO-ALVO.....	46
4.4. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	46
4.5. TAMANHO AMOSTRAL	46
4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
4.7. DEFINIÇÃO DE TERMOS	47
4.8. DEFINIÇÃO DAS VARIÁVEIS DO ESTUDO	47
4.9. COLETA DOS DADOS.....	51

4.10. AMOSTRA BACTERIANA.....	51
4.10.1 Análise do Perfil de Susceptibilidade aos Antimicrobianos.....	52
4.11. ANÁLISE MOLECULAR DAS AMOSTRAS BACTERIANAS.....	53
4.11.1 Extração de DNA total	53
4.11.2 ERIC-PCR	54
4.11.3 Detecção dos genes relacionados à produção de MBL	55
4.11.4 Detecção de genes <i>bla</i> _{KPC}	56
4.11.5 Detecção de genes <i>bla</i> _{TEM} e <i>bla</i> _{CTX-M}	57
4.12. LIMITAÇÕES METODOLÓGICAS DO ESTUDO.....	60
4.13 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	61
5. Resultados	62
5.1 Primeiro relato de <i>bla</i> _{SPM-1} em <i>Acinetobacter baumannii</i> no Brasil.....	62
5.2 Detecção de genes <i>bla</i> _{SPM-1} , <i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{TEM} e <i>bla</i> _{CTX-M} em isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> spp. e <i>Klebsiella</i> spp. provenientes de pacientes oncológicos com infecções relacionadas à assistência à saúde.....	68
5.3 Caracterização clínica e epidemiológica de infecções ocasionadas por <i>Klebsiella</i> spp., <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Acinetobacter</i> spp. multidroga resistentes em pacientes com neoplasias sólidas, Pernambuco, Brasil.....	96
6. Conclusões	115
REFERÊNCIAS	116
APÊNDICE A.....	132
FORMULÁRIO DA PESQUISA	132
APÊNDICE B.....	134
Title: First report of <i>bla</i>_{SPM-1} in <i>Acinetobacter baumannii</i> in Brazil	134
APÊNDICE C.....	143
Title: Detection of <i>bla</i>_{SPM-1}, <i>bla</i>_{KPC}, <i>bla</i>_{TEM} and <i>bla</i>_{CTX-M} genes in isolates of <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, <i>Acinetobacter</i> spp. and <i>Klebsiella</i> spp. from cancer patients with healthcare associated infections	143
ANEXO	169
Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	169

1. Introdução

As neoplasias malignas sólidas no Brasil representam 77,1% do número de casos novos de câncer, segundo estimativa do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) para o ano de 2014, excluindo os casos de câncer de pele não melanoma (INCA, 2014). Em Pernambuco, magnitude semelhante foi registrada no Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS), no período de novembro de 2012 a abril de 2014, onde as neoplasias malignas sólidas representaram 68,8% do total de internamentos por este agravo na rede pública do estado de Pernambuco (Brasil, 2015).

No paciente com câncer, assim como em outros pacientes que sofrem internamentos por longos períodos, as infecções relacionadas à assistência a saúde (IRAS) persistem como um problema de saúde pública (Cornejo-Juárez et al., 2015). Ademais, o diagnóstico de infecções neste grupo de pacientes é muitas vezes dificultado por uma manifestação sutil ou atípica, elevando o risco de ocasionar sepse grave e morte (Gudiol et al., 2011; Pongas et al., 2012). Adicionalmente, a utilização de medicamentos citotóxicos potentes e ferramentas diagnósticas cada vez mais invasivas são apontadas como fatores relacionados à elevada frequência e gravidade das IRAS em pacientes com câncer (Maschmeyer; Haas, 2008; Wang et al., 2011).

Outro fator preocupante é a crescente taxa global de infecções relacionadas a bactérias multidroga resistentes (MDR) (Aly; Al-Mousa; Al Asar-el., 2008; Gudiol et al., 2011), definidas como resistentes a pelo menos três diferentes classes de antibióticos (CDC, 2013). As infecções provocadas por estes patógenos merecem destaque por reduzirem as opções de tratamento da infecção, além de elevarem os custos da hospitalização e agravarem o estado de saúde dos pacientes (Gudiol et al., 2011; Neidell et al., 2012; Vasudevan et al., 2015).

Dentre os microrganismos mais frequentemente associados a IRAS em pacientes com câncer estão a *Klebsiella* spp., *P. aeruginosa*, e *Acinetobacter* spp., os quais apresentam

elevadas taxas de resistência aos antimicrobianos, e são consideradas bactérias MDR de grande importância clínica (Pongas et al., 2012; Andria et al., 2015; Marín et al., 2014). Neste grupo de bactérias, uma causa importante de multirresistência é a produção de β -lactamases, codificadas pelo gene *bla*, devido à ampla variedade de enzimas existentes, incluindo as β -lactamases de espectro estendido (ESBL) como TEM, SHV e CTX-M, e as carbapenemases como GES, *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) e metalo- β -lactamases (MBL) como IMP, VIM, SPM e NDM (Bassetti; Righi 2013; Chaudhary; Payasi, 2014; Wang et al., 2011; Zafer et al., 2014).

Diante do exposto, o presente trabalho teve por objetivo realizar um estudo epidemiológico e molecular de infecções ocasionadas por *P. aeruginosa*, *Klebsiella* spp. e *Acinetobacter* spp. em pacientes com neoplasias sólidas, internados em um hospital de Recife-PE no período entre novembro de 2012 e abril de 2014.

Tal investigação pode contribuir para o conhecimento da epidemiologia das IRAS em pacientes com neoplasias sólidas, bem como ressalta a importância da vigilância contínua de bactérias MDR no ambiente hospitalares. Também reforça a necessidade aplicação de medidas de controle de IRAS, buscando minimizar a disseminação destes patógenos, tais como a adesão aos protocolos de higiene das mãos e descontaminação ambiental.

2. Revisão de Literatura

2.1 INFECÇÕES RELACIONADAS À SAÚDE EM PACIENTES COM CÂNCER

As infecções bacterianas são uma das principais causas de complicações e de morte em pacientes com cânceres hematológicos e neutropenia induzida por quimioterapia (Bucaneve et al., 2005). As bacteriemias são a principal causa de morte em pacientes com câncer seja diretamente ou por interferir no cronograma da quimioterapia (Paul et al., 2010; Pongas et al., 2012). Os principais patógenos causadores de IRAS em pacientes com câncer são *P. aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Acinetobacter baumannii* e *Staphylococcus aureus* (Andria et al., 2015; Chaudhary; Payasi, 2014; Pongas et al., 2012).

Nos pacientes oncológicos, os fatores de risco para a infecção por microrganismos patogênicos podem sobrepor-se, uma vez que, além do imunocomprometimento causado pela própria patologia, estes pacientes são submetidos a tratamento cirúrgico, quimioterápico e/ou radioterápico, sendo a neutropenia induzida pela quimioterapia, um dos maiores riscos para infecção nessa população (Cavalcante, 2000; Maschmeyer; Haas, 2008).

Complicações infecciosas acontecem em aproximadamente 60,0% dos pacientes após doses elevadas de quimioterapia, radioterapia e transplante de células blásticas hematopoiéticas autólogas. As complicações também dependem dos regimes de tratamento utilizados (poliquimioterapia *versus* monoterapia; regimes com ou sem irradiação total do corpo) e um alto-risco para infecção está associado à neutropenia por um período superior a 10 dias (Larsson; Bjorkstrand; Ljungman, 1998; Wang et al., 2011; Yamasaki et al., 2008).

Fatores de risco para infecção em pacientes com câncer incluem deficiências imunes subjacentes, comorbidades e efeitos adversos relacionados ao tratamento. Entretanto, é importante observar que os fatores de risco estão associados a agentes infecciosos específicos,

e a compreensão de cada fator de risco individual pode ajudar as estratégias diretas para diagnóstico e tratamento (Zembower, 2014).

Para melhor esclarecer os casos, estudos voltados para descrição de características da população e pesquisa de fatores de risco para o desenvolvimento de IRAS em pacientes com câncer têm sido desenvolvidos em todo mundo (Andria et al., 2015; Costa; Atta; Silva, 2015; Gudiol et al., 2011; Marín et al 2014; Pongas et al., 2012; Ram et al., 2012).

Pongas et al. (2012) estudaram uma série histórica de infecção em pacientes com câncer, no MD Anderson Cancer Center da Universidade do Texas no período de 10 anos (1998-2008), revisando os prontuários retrospectivamente. Diversas características foram avaliadas e observaram que de 598 pacientes que foram submetidos a consultas de especialistas em doenças infecciosas, a maioria deles tinha tumores sólidos (53%), predominantemente câncer de mama, e o linfoma não-Hodgkin foi a neoplasia maligna hematológica mais comum. Quase metade dos pacientes (45%) tinham tumores ativos, mas alguns deles apresentavam neutropenia severa (8%) ou estavam recebendo doses elevadas de corticosteróides (17%). De 337 organismos patogênicos isolados, os mais prevalentes foram micobactérias atípicas (16%), *S. aureus* metilicina resistentes (13%), *Aspergillus* sp. (11%) e *P. aeruginosa* (8%).

Ram et al. (2012) pesquisaram quadros de infecção em 271 pacientes neutropênicos febris (quadro inicial e subsequente de febre) de uma unidade onco-hematológica em Israel e observaram que as bactérias Gram-negativas foram predominantes tanto no quadro inicial de febre como nos subseqüentes (64% e 71%, respectivamente). Os patógenos mais frequentes no quadro de febre inicial foram *E. coli* (28,8%), *S. aureus* (13,5%), *P. aeruginosa* (9,6%), *Klebsiella pneumoniae* (8,7%) e nos quadros de febre subseqüentes foram *E. coli* (25,3%), *Enterococcus* sp. (16,0%), *K. pneumoniae* (12,0%) e *P. aeruginosa* (12,0%). Foi observada também uma redução no padrão de susceptibilidade aos antimicrobianos nos isolamentos dos

quadros subsequentes de febre, sugerindo que a exposição anterior aos antibióticos impacta significativamente a susceptibilidade aos antimicrobianos.

Outro estudo com o objetivo de verificar o perfil de IRAS em pacientes com câncer foi realizado no Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil, E.P.E., em Portugal, no o período de Setembro de 2009 a Fevereiro de 2010. Neste estudo, os patógenos mais frequentemente isolados foram *E.coli* (16,0%), seguido por *Staphylococcus* coagulase negativa (13,4%), *P. aeruginosa* (12,8%), *S. aureus* (12,8%), *Candida* spp. (9,1%), *Enterococcus faecalis* (9,1%), *K. pneumoniae* (7,0%) e *Proteus mirabilis* (5,9%). Também foi verificado que as infecções foram mais prevalentes em homens e a média de idades da população estudada foi 62,9 anos. O tipo de infecção mais comum foi a infecção respiratória (Alexandre et al., 2010).

Em pacientes pediátrico, Tang et al. (2012) investigaram o perfil imunológico e quadros de infecção no departamento de Oncologia hematológica do Children's Hospital of Zhejiang, da Faculdade de Medicina da China (University School of Medicine), de agosto de 2005 a maio de 2009. Foram investigadas 145 crianças com câncer hematológico, que apresentaram estado febril e hemocultura positiva. As idades variaram entre 0,58 - 15,17 anos (média de 5,75 anos). Na maioria dos casos, a infecção foi provocada por bactérias Gram-negativas (60,7%), seguido pelas bactérias Gram-positivas (37,2%) e fungos (2,1%). Os principais patógenos envolvidos foram *E. coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *K. pneumoniae* e *Serratia marcescens* e *P. aeruginosa*, respectivamente.

Em relação pesquisa de fatores de risco para infecção bacteriana invasiva, Santolaya et al. (2001) avaliaram 257 crianças com câncer que apresentavam um quadro neutropênico febril, procedentes de cinco hospitais em Santiago no Chile no período entre maio de 1996 e setembro de 1997. Cinco parâmetros foram estatisticamente significativos para a infecção bacteriana invasiva. Ranqueados por ordem de significância, foram os seguintes: níveis de

proteína C reativas superiores a 90 mg/L (risco relativo [RR] 4,2; Intervalo de confiança de 95% [IC_{95%}] 3,6 a 4,8); presença de hipotensão (RR 2,7; 95% IC_{95%} 2,3 a 3,2); leucemia recidivante (RR 1,8; 95% IC_{95%} 1,7 a 2,3); contagem de plaquetas igual ou inferior a 50.000/mm³ (RR 1,7; 95% IC_{95%} 1,4 a 2,2); e quimioterapia recente (< 7 dias) (RR 1,3; 95% IC_{95%} 1,1 a 1,6). Outros fatores de risco postulados, como magnitude da febre e contagem de monócitos não foram fatores de risco independentes nesta população estudada.

No que tange aos efeitos de intervenções feitas pela vigilância ativa das IRAS, Nagao et al. (2011) investigaram a incidência de infecção provocada por *P. aeruginosa* multirresistente produtora de metalo-β-lactamase (MBL) em 1.240 leitos terciários de uma unidade onco-hematológica do Hospital Universitário de Kyoto, em Kyoto, Japão. Estratégias de controle de infecção em 2004 incluíram o reforço de precauções de contato, análise de fatores de risco para a infecção por *P. aeruginosa* multirresistente produtora de MBL e cessação de coleta de urina. No entanto, novas infecções foram identificadas em 2006, o que levou a reforçar a limpeza do ambiente, vigilância de rotina ativa, e restringindo a utilização carbapenem. Entre 2004 e 2010, 17 pacientes na unidade foram infectados com cepas de *P. aeruginosa* produtora de MBL. Os últimos cinco pacientes infectados foram encontrados pela vigilância ativa de rotina, mas a transmissão horizontal era indetectável. O surto na unidade onco-haematológica foi finalmente contido em 2008, controlada através de intervenções multidisciplinares.

Também voltado para vigilância de IRAS, Cataneo et al. (2011), investigaram a sensibilidade e especificidade dos critérios para isolamento de pacientes admitidos no Hospital de Câncer de Barretos, em São Paulo, Brasil. Este estudo se baseou nas primícias de que o isolamento precoce de pacientes possivelmente colonizados por microrganismos multirresistentes, pode minimizar sua disseminação, reduzindo os casos de IRAS e os custos associados às mesmas. A população estudada foi composta por 61 pacientes, admitidos no

período de 01 março a 31 de agosto de 2009, e procedentes de outros hospitais. Os microrganismos resistentes mais frequentemente isolados foram *A. baumannii* (36,3%), *P. aeruginosa* (21,9%), *S. aureus* resistentes à meticilina (14,7%), *K. pneumonia* (11%) e *E. coli* (7,8%). E dentre os critérios de isolamento investigados estava o uso de antimicrobianos no hospital de origem, dias de internação no hospital de origem maior ou igual a sete dias e internação em UTI no hospital de origem. Os resultados da pesquisa mostraram que os critérios clínicos adotados para a instituição apresentaram sensibilidade de 90,0%, e especificidade de 6,5%.

No que se refere ao tratamento profilático, Bucaneve et al. (2005) avaliaram a ação da levofloxacina para prevenir infecções em 760 pacientes com três diferentes tipos de câncer (leucemia aguda, tumor sólido e linfoma) que desenvolveram neutropenia induzida pelo tratamento quimioterápico contra as neoplasias em 35 centros médicos da Itália. Os autores constataram que a profilaxia com levofloxacina em pacientes de alto risco com neutropenia foi efetiva. Em contrapartida, outros estudos apontam o uso de antimicrobianos anterior como fator de risco para o desenvolvimento de infecções provocadas por patógenos MDR (Andria et al., 2015; Costa; Atta; Silva, 2015).

Adicionalmente, estudos demonstram que a terapia empírica inadequada de antimicrobianos está associada a piores resultados em pacientes com diversos tipos de infecções. Especificamente, a terapia empírica inadequada e o atraso no tratamento apropriado estão vinculados ao surgimento de patógenos MDR, bem como ao aumento da morbidade, mortalidade e do tempo de permanência hospitalar (CDC, 2010; Kumar et al., 2009).

Assim, estes estudos mostram que *P. aeruginosa*, *Klebsiella* spp. e *Acinetobacter* spp. estão entre os patógenos mais frequentes em IRAS envolvendo pacientes com câncer, e que múltiplos fatores podem estar envolvidos na gênese destas infecções.

2.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria ubíqua, amplamente distribuída na natureza, incluindo no solo, na matéria orgânica em decomposição, na vegetação e na água, também pode ser encontrada em ambientes hospitalares úmidos, como pias, banheiros, equipamentos de ventilação mecânica e de diálise (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2009). Esta bactéria é considerada um patógeno oportunista frequentemente relacionada às IRAS, multidroga resistência e mortalidade dos pacientes acometidos, especialmente nos em hospitalizados por longos períodos de permanência ou ambulatoriais imunocomprometidos (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2009; Oliveira; Kovner; Silva 2010).

Pertencentes à família *Pseudomonadaceae*, gênero *Pseudomonas*, apresentam-se como bacilos Gram-negativos retos ou ligeiramente curvos, com tamanho de 0,5-1,0µm por 1,5-4,0µm, tipicamente dispostos aos pares, não fermentadores de carboidratos, aeróbios estritos, móveis, não produtor de esporos. Possuem necessidades nutricionais mínimas e toleram uma ampla variedade de temperaturas (4°C a 42°C) (Madigan; Martinko; Parker, 2004; Murray; Rosenthal; Pfaller, 2009; Pitt; Simpson, 2006).

De acordo com a raiz etimológica, o nome *Pseudomonas* refere-se à aparência do microrganismo na coloração de Gram, o qual se apresenta disposta aos pares, assemelhando-se a células únicas (pseudes, "falso"; monas, uma "unidade"). E a espécie *P. aeruginosa* tem origem relacionada à pigmentação verde resultante da produção de piocianina e pioverdina (aeruginosa, cheio de "ferrugem" ou verde) (Pfaller, 2009; Oliveira; Kovner; Silva 2010).

Pode ser inicialmente identificada por exame macroscópico das colônias, as quais se apresentam como colônias grandes, espalhadas e geralmente β - hemolíticas em meio ágar sangue e com pigmentação verde e com odor de fruta (semelhante à uva), produzido pela piocianina em meio específico para a espécie, que é o ágar cetrimide (Murray; Rosenthal;

Pfaller, 2009; Winn et al., 2008). Em sequencia, a identificação procede com uma bateria de testes bioquímicos que tem como resultado: fermentação de açúcares negativa, oxidação da glicose em meio basal (oxidase positivo), utilização de citrato como única fonte de carbono (citrato positivo), inabilidade de descarboxilar a lisina (lisina negativo) e incapacidade de utilização do aminoácido triptofano (indol negativo) (Winn et al., 2008).

Diversos fatores de virulência estão envolvidos na patogênese da infecção por *P. aeruginosa*, a qual é dividida em três fases, são elas: adesão e colonização bacteriana, invasão local e disseminação sistêmica da infecção, contudo, a infecção pode ser debelada em qualquer uma das etapas (Todar, 2004). Os principais fatores de virulência envolvidos nesse processo são as adesinas (cápsula de alginato, lipopolissacarídeos [LPS], flagelos e pili) e as enzimas e toxinas secretadas (exotoxina A, fosfolipase C, exoenzima S, exoenzima T, elastases, proteases, hemolisinas [ramnolipídios], sideróforos e pigmentos tais como piocianina, pioverdina, piorrubina e piomelanina) (Freitas; Barth, 2004; Kiska; Gilligan, 2003; Murray; Rosenthal; Pfaller, 2009).

As doenças ocasionadas pela *P. aeruginosa* incluem infecções do trato respiratório, trato urinário, pele e tecidos moles, ouvido e olhos, assim como bacteriemia e endocardite além de outras consequências em pacientes imunocomprometidos (Madigan; Martinko; Parker, 2004; Murray; Rosenthal; Pfaller, 2009; Winn et al., 2008).

2.3 *Acinetobacter* spp.

O gênero *Acinetobacter* é composto por bactérias saprófitas ubíquos, encontrados na natureza e no ambiente hospitalar. Assim como a *P. aeruginosa*, possui predileção por superfícies úmidas, como equipamentos de ventilação mecânica, porém diferente de outros bastonetes Gram-negativos, é capaz de sobreviver em superfícies secas, como a pele (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2009).

A taxonomia deste gênero permaneceu indefinida por anos. O gênero que hoje é conhecido como *Acinetobacter* spp., antes foi denominado de *Micrococcus calcoaceticus*, *Bacterium anitratum* e *Achoromobacter* (Henriksen, 1973). Apesar do nome *Acinetobacter* spp. ter sido proposto em 1957 por Brisou e Prevout para descrever um novo gênero para as espécies não móveis de *Achoromobacter*, somente onze anos depois, após estudo aprofundado das características do novo gênero foi que a denominação *Acinetobacter* foi aceita pelos taxonomistas (Henriksen, 1973).

A origem etimológica do nome dado a este gênero se deve a característica de ser um bastonete imóvel (akinetos, “incapaz de mover” e bactrium, “bastonetes”) (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2009). Estes são cocobacilos Gram-negativos arredondados, aeróbios estritos, que frequentemente se apresentam como diplococos, assemelhando-se a morfologia de *Neisseria gonorrhoeae*, o que favoreceu a designação taxonômica arcaica do gênero “*Mima*” (imitador) (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2009; Winn et al., 2008).

A identificação inicial pode ser feita em meio ágar sangue, no qual as colônias apresentam-se com 0,5-2,0mm de diâmetro, translúcidas a opacas (nunca pigmentadas). Convexas e inteiras. O gênero *Acinetobacter* é subdividido em dois grupos: as espécies que oxidam a glicose (*A. baumannii* é a mais frequente), e as espécies que não oxidam a glicose (*A. lowffii* e *A. haemolyticus* são as mais frequentes). A maioria das cepas cresce em meio ágar MacConkey, onde podem produzir uma leve cor rosada indicando oxidação da glicose presente no meio (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2009; Winn et al., 2008). Em seguida a confirmação do gênero é feita por meio de testes bioquímicos que são o teste de oxidase (negativa), redução de nitrato (negativo), pigmentação (negativa) e motilidade (negativa) (Winn et al., 2008).

Inicialmente, apenas as espécies *Acinetobacter calcoaceticus* e *Acinetobacter lwoffii* foram consideradas pertencentes ao gênero *Acinetobacter*, porém, estudos fenotípicos e de

hibridização do DNA proporcionaram ampliação deste grupo, composto por 23 espécies com nomes válidos e nove genoespécies provisoriamente designadas (Peleg; Seifert; Paterson, 2018; Peleg et al., 2012).

Estas bactérias podem colonizar ou fazer parte da microbiota da orofaringe de um pequeno número de indivíduos sadios, podendo, esta população, aumentar durante o período de hospitalização. Todavia, a maioria das infecções humanas é causada por *A. baumannii*, que comumente está relacionado à multidroga resistência ou mesmo pan-resistencia (resistência a todas as classes de antimicrobianas testadas), dificultando o tratamento da infecção (Montefour et al., 2008; Murray; Rosenthal; Pfaller, 2009).

Os atributos que tornam as espécies de *Acinetobacter* mais hábeis em causar surtos em humanos e doença ainda são mal compreendidos. Porém, alguns mecanismos de virulência já foram identificados em *A. baumannii*, incluindo aquisição de sistemas mediados por ferro de sideróforos, formação de biofilme, adesão e função da proteína de membrana externa, lipopolissacarídeos (LPS), formação de cápsula e quorum-sensing (Peleg et al., 2012).

Assim como *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. são patógenos oportunistas que acometem principalmente pacientes expostos a fatores de risco como uso de antimicrobianos de amplo espectro, cirurgia, ou sob ventilação respiratória mecânica. Frequentemente estão relacionados a infecções no trato respiratório, trato urinário e feridas; podendo causar septicemia (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2009). Um estudo clínico recente mostrou que *A. baumannii* foi um preditor independente de mortalidade (Chuang et al., 2011).

2.4 *Klebsiella* spp.

Klebsiella spp. também são ubíquas na natureza, sendo encontradas em água de superfície, esgoto, solo e plantas, mais comumente. Também podem colonizar ou fazer parte

da microbiota nas superfícies mucosas de mamíferos, tais como os seres humanos, cavalos, ou porcos (Podschun; Ullmann, 1998).

O gênero *Klebsiella* spp. pertence a família Enterobacteriaceae, que é formado por bacilos Gram-negativos de tamanho moderado ($0,3$ a $1,0 \times 1,0$ a $6,0\mu\text{m}$), anaeróbios facultativos e que crescem em uma grande variedade de meios seletivos e não seletivos, como ágar MacConkey e ágar sangue, respectivamente (Madigan; Martinko; Parker, 2004; Murray; Rosenthal; Pfaller, 2009). O nome *Klebsiella* foi dado, no final do século XIX, em homenagem ao médico e bacteriologista alemão chamado Theodor Albrecht Edwin Klebs, considerado descobridor do gênero (Winn et al, 2008).

Como as demais Enterobacteriaceae, as bactérias pertencentes ao gênero *Klebsiella* spp. fermentam glicose, reduzem o nitrato, são catalase positiva e oxidase negativa e têm necessidades nutricionais simples, com exceção da espécie *Klebsiella granulomatis* que não pode ser cultivada em meios convencionais (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2009; Winn et al., 2008).

Os principais fatores de patogenicidade de *Klebsiella* spp. estudados são: LPS (oito sorotipos), cápsula composta por polissacarídeos complexos (77 sorotipos), sideróforos e adesinas (pili tipo 1 [MSHA], pili tipo [MR/K-HA], fímbria KPF-28, CF29K [não fimbrial] e adesinas agregadoras) (Podschun; Ullmann, 1998). Destes, destaca-se a cápsula polissacarídica que é responsável pela aparência mucoide das colônias isoladas em meios de cultivo e pelo aumento da virulência dos microrganismos *in vivo* (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2009).

Bactérias do gênero *Klebsiella* spp. podem causar infecções adquirida na comunidade ou relacionada à assistência a saúde, especialmente em pacientes imunocomprometidos. As infecções mais comumente ocasionadas por estas bactérias estão: pneumonia, infecções do trato urinário e de feridas, bacteriemia, enterites, meningite em crianças e sepse (Winn et al.,

2008). Dentre estas doenças, destaca-se a pneumonia por frequentemente envolver destruição necrótica dos espaços alveolares, formação de cavidades e produção de escarro com sangue (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2009).

Inicialmente, o gênero *Klebsiella* foi composto pelas seguintes espécies: *K. oxytoca*, *K. terrigena*, *K. planticola*, *K. ornithinolytica* e *K. pneumoniae* (Ørskov; Ørskov, 1984). Posteriormente, com a análise da estrutura filogenética, duas novas espécies foram descritas. A primeira delas foi *Klebsiella variicola*, que vinha sendo identificada como *K. pneumoniae* através dos métodos de identificação convencionais, porém a análise das sequências dos genes *rpoB*, *gyrA*, *mdh*, *infB*, *phoE* e *nifH*, levaram a ser considerada como uma nova espécie (Rosenblueth et al., 2004); a segunda foi a *Klebsiella singaporensis*, cuja nova classificação baseou-se nas sequências dos genes de RNAr 16S e do gene *rpoB*. Outras novas espécies de *Klebsiella* propostas que ainda foram pouco investigadas são: *K. milletis* e *K. senegalensis* (Alves et al., 2006).

Dentre as espécies, as mais frequentemente envolvidas em infecções em humanos são *Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella oxytoca*, sendo a *K. pneumoniae* a espécie clinicamente mais importante, por estar associada a altas taxas de mortalidade (Haryani et al., 2007).

2.5 RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

O problema mais importante relacionado às doenças infecciosas na atualidade é o rápido desenvolvimento de resistência aos antibióticos. Os mecanismos de resistência bacterianos são um fenômeno que pode ser intrínseco ou adquirido e podem ocorrer por alteração da permeabilidade, bombas de efluxo, alteração genética do alvo e ação enzimática, conforme apresentado na figura 1 (Strelkauskas, Strelkauskas, Moszyk-Strelkauskas, 2010).

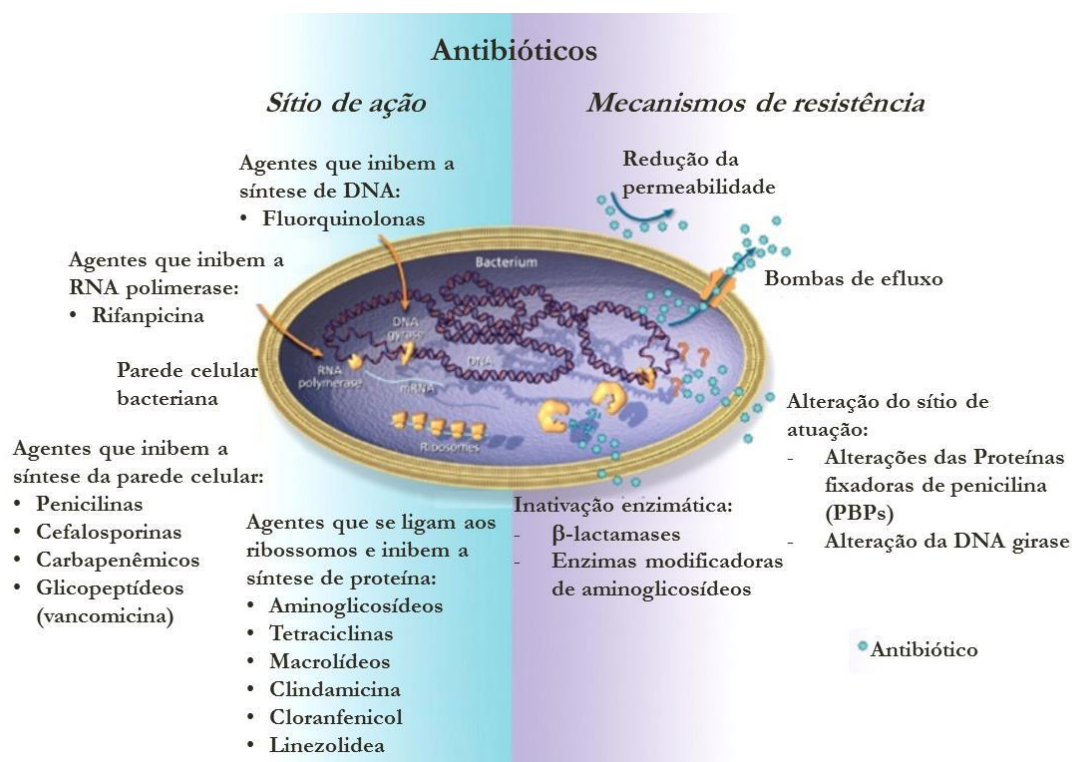


Figura 1. Sítios de ação e possíveis mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos.

Fonte: Mulvey; Simor, 2009 (traduzido).

Dentre estes mecanismos, o presente estudo explanará a respeito da produção de enzimas β -lactamases, por esta apresentar uma amplamente disseminação no mundo, além de apresentar uma crescente diversidade estrutural e de espectro de atividade, com mais de 1600 variantes enzimáticas até o presente momento (Jacoby; Bush, 2015; Livermore & Woodford, 2006).

2.2.1 β -LACTAMASES

As β -lactamases são enzimas produzidas por algumas bactérias e são responsáveis por sua resistência aos antibióticos β -lactâmicos como as penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactams. Estes antibióticos têm como elemento comum em suas estruturas moleculares um anel β -lactâmico. As enzimas β -lactamases atua por meio da

quebra da ligação amida no anel β -lactâmicos, resultando na inativação dos fármacos pertencentes a essa classe antimicrobiana. Estas enzimas são codificadas por genes *bla* comumente localizados em elementos genéticos móveis, sendo capazes de trocar material genético entre bactérias de uma mesma espécie, ou mesmo, entre gêneros distintos (Livermore; Woodford, 2006).

Dois sistemas de classificação para as β -lactamases são adotados, sendo um de acordo com as características moleculares e outro com os grupos funcionais, conforme descrito na tabela 1 (Bush; Jacoby, 2010).

Tabela 1 – Esquema de classificação funcional e molecular das β -lactamases.

Grupo Bush-Jacoby (2009)	Grupo Bush-Jacoby-Medeiros (1995)	Classe Molecular Ambler (1980)	Substrato	Inibida por		Característica(s) definidora(s)	Enzimas representativa(s)
				CA ou TZB ^a	EDTA		
1	1	C	Cefalosporinas	Não	Não	Hidroliza melhor cefalosporinas do que benzilpenicilinas; hidroliza cefamicinas	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	NI ^b	C	Cefalosporinas	Não	Não	Hidrólise aumentada de cefazidima e frequentemente de outros oximino- β -lactâmicos	GCI, CMY-37
2 ^a	2 ^a	A	Penicilinas	Sim	Não	Hidroliza melhor benzilpenicilina do que cefalosporinas	PC1
2b	2b	A	Penicilinas, Cefalosporinas de primeira geração	Sim	Não	Hidrólise semelhante de benzilpenicilina e cefalosporinas.	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Cefalosporinas de espectro-estendido, monobactams	Sim	Não	Hidrólise aumentada de oximino- β -lactâmicos (cefotaxima, cefazidima, ceftriaxona, cefepima, o aztreonam)	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Penicilinas	Não	Não	Resistência a ácido clavulânico, subactam e tazobactam	TEM-30, SHV-10
2ber	NI	A	Cefalosporinas de espectro-estendido, monobactams	Não	Não	Hidrólise aumentada de oximino- β -lactâmicos combinada com resistência a ácido clavulânico, subactam e tazobactam	TEM-50
2c	2c	A	Carbenicilinas	Sim	Não	Hidrólise aumentada de carbenicilina	PSE-1, CARB-3
2ce	NI	A	Carbenicilinas, Cefepime	Sim	Não	Hidrólise aumentada de carbenicilina, cefepime e ceftiproma	RTG-4
2d	2d	D	Cloxacilina	Variável	Não	Hidrólise aumentada de cloxacilina ou oxacilina	OXA-1, OXA-10
2de	NI	D	Cefalosporinas de espectro-estendido	Variável	Não	Hidrólise de cloxacilina ou oxacilina e oximino- β -lactâmicos	OXA-11, OXA-15
2df	NI	D	Carbapenênicos	Variável	Não	Hidrólise de cloxacilina ou oxacilina e carbapenênicos	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Cefalosporinas de espectro-estendido	Sim	Não	Hidrólise de cefalosporinas. Inibida por ácido clavulânico mas não por aztreonam	CepA
2f	2f	A	Carbapenênicos	Variável	Não	Hidrólise aumentada de carbapenênicos, oximino- β -lactâmicos, cefamicinas	KPC-2, IMI-1, SME-1
3 ^a	3	B (B1)	Carbapenênicos	Não	Sim	Hidrólise de amplo espectro, incluindo carbapenênicos, mas não monobactâmicos	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1
3b	3	B (B3) B (B2)	Carbapenênicos	Não	Sim	Hidrólise preferencial de carbapenênicos	L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1 CphA, Sfh-1
NI	4	Desconhecida					

^a CA, ^a CA, ácido clavulânico; TZB, tazobactam. ^b NI, não incluído.
Fonte: Bush & Jacoby, 2010 (traduzido).

2.2.1.1 β -LACTAMASES DO TIPO KPC

Carbapenemases pertencentes ao grupo A da classificação de Ambler (Tabela 1), as enzimas *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) possuem 24 variantes identificadas até o presente momento (Jacoby; Bush, 2015). A KPC está envolvida em surtos endêmicos e pseudo-endêmicos em países ao redor de todo o mundo (Hirsch; Tam, 2010).

A enzima KPC é codificada pelo gene *bla*_{KPC} que, em sua maioria, localiza-se no transposon Tn4401, e está cercado pelas sequencias de inserção ISKpn7 (*upstream*) e ISKpn6 (*downstream*). Entre ISKpn7 e *bla*_{KPC} pode haver uma deleção de 100 a 200 pares de base (pb), levando a formação das variantes do Tn4401a (deleção de 100pb em relação a Tn4401b), Tn4401b (variante mais completa) e Tn4401c (deleção de 200pb em relação a Tn4401b). A primeira variante do transposon caracterizada foi a Tn4401a, obtida a partir de duas *K. pneumoniae* provenientes de pacientes internados em um hospital em Paris, de origem de uma hospital na Grécia e outro nos Estados Unidos da América. As primeiras variantes Tn4401b foram obtidas a partir de dois isolados de *K. pneumoniae* e de *P. aeruginosa* originários da Colômbia, e a variante Tn4401c foi inicialmente caracterizada a partir de *E. coli* proveniente de um hospital de Paris. (Naas et al., 2008; Nordmann; Cuzon; Naas, 2009; Rice et al., 2008).

Isolados KPC-positivos são capazes de hidrolisar diversos β -lactâmicos, incluindo as cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos, no entanto, são inibidos pelo ácido clavulânico e tazobactam (Zhang et al., 2008). Observa-se também que a concentração inibitória mínima (CIM) dos carbapenêmicos diminui na presença de ácido clavulânico, devido à inibição da enzima (Queenan; Bush, 2007).

Estudos demonstram que isolados de *K. pneumoniae* KPC-positivos apresentam redução da susceptibilidade ou resistência a todos os β -lactâmicos, além de serem resistentes a

ciprofloxacina, aminoglicosídeos e fluorquinolonas (Poirel; Pitout; Nordmann, 2007; Roche et al., 2009) e sensíveis a polimixina B e tigeciclina (Leavitt et al., 2007; Urban et al., 2008). Este perfil de resistência limita as opções terapêuticas disponíveis para o tratamento de infecções graves, restringindo o uso de tigeciclina e polimixinas (Monteiro et al., 2009).

Perfil de susceptibilidade semelhante foi observado em isolados de *P. aeruginosa* KPC-positivos, sendo frequente a ocorrência de isolados resistentes a todos os β -lactâmicos e sensíveis apenas aos polipeptídeos (polimixina B e colistina) ou a um polipeptídeo associado aos aminoglicosídeos (amicacina e gentamicina) (Villegas et al., 2007; Jácome et al., 2012).

Além de *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*, o gene *bla*_{KPC} já foi detectado em isolados de *K. oxytoca*, *Enterobacter* spp., *E. coli*, *Salmonella* spp., *Citrobacter freundii*, *Serratia* spp. e *Acinetobacter* spp. (Nordmann; Naas; Poirel, 2011; Robledo et al., 2010).

Porém, também tem sido observado que a resistência aos carbapenêmicos pode não ser detectada *in vitro* pelos testes convencionais em isolados produtores de KPC, o que pode levar a uma falha terapêutica e seleção de bactérias produtoras dessa enzima (CLSI, 2009; Pfeifer; Cullik; Witte, 2010). Esta variação na capacidade de hidrólise dos carbapenêmicos *in vitro* é dependente do gene de regulação da expressão da enzima, do ambiente genético no qual o gene *bla*_{KPC} está localizado e da presença ou ausência de alteração na permeabilidade da membrana externa (Kitchel et al., 2010; Pfeifer; Cullik; Witte, 2010).

2.2.1.2 β -LACTAMASES DO TIPO TEM

Atualmente existem 220 variantes da enzima TEM (Jacoby; Bush, 2015). Destas, as enzimas TEM-1, TEM-2, TEM-90 (anteriormente denominada TLE-2) e TEM-110 são consideradas β -lactamases de espectro limitado, pertencentes à classe A de Ambler e ao grupo funcional 2 subgrupos 2b e 2c (Tabela 1). Estas enzimas perdem a atividade hidrolítica inibida

na presença de inibidores de serino β -lactamase, como o ácido clavulânico, o subactam e o tazobactam. As mesmas apresentam potente atividade contra as penicilinas e cefalosporinas de primeira e segunda geração, com a particularidade que as enzimas do grupo 2c hidrolisam carbenicilina com igual eficiência com a qual hidrolisam benzilpenicilina (Strateva; Yordanov, 2009).

As enzimas TEM-1 e TEM-2 são codificadas por genes *bla*_{TEM}, localizados predominantemente no cromossomo bacteriano (Gupta, et al., 2007). Mutações pontuais no gene *bla*_{TEM} podem ocasionar remodelagem do sítio ativo da enzima e expansão da atividade hidrolítica sobre as oximino-cefalosporinas, como a cefotaxima e ceftazidima (Jacoby & Bush, 2005).

Outras enzimas TEM, derivadas de TEM-1/TEM-2, são consideradas β -lactamases de espectro estendido (ESBL), as quais também pertencem à classe A na classificação de Ambler, e compõem ao grupo funcional 2, subgrupos 2e (Tabela 1). As ESBL apresentavam atividade hidrolítica contra as cefalosporinas de amplo espectro, além de hidrolisarem as penicilinas, as cefalosporinas de primeira e segunda geração e o aztreonam. Vale ressaltar que a maioria das ESBL é sensível à ação de inibidores de serino β -lactamase, assim como as β -lactamases de espectro limitado (Livermore, 2008).

A primeira ESBL do tipo TEM descrita na literatura em 1987 foi a TEM-3, proveniente de isolados clínicos de *K. pneumoniae* (Sirost.; Labia; Thabaut, 1987). Posteriormente, novas variantes de ESBL do tipo TEM foram descritas, sendo codificadas por genes localizados em transposons e plasmídeos, o que permite a rápida disseminação entre espécies bacterianas distintas (Haeggman et al., 2004; Jacoby & Muñoz-Price, 2005).

2.2.1.3 β -LACTAMASES DO TIPO CTX-M

As enzimas cefotaximase (CTX-M) são consideradas ESBL, que pertence à classe A de Ambler e ao grupo funcional 2, subgrupos 2be (Tabela 1). Este grupo possui 172 variantes, porém, a sequência de aminoácido de CTX-M-14 e CTX-M-18, CTX-M-55 e CTX-M-57, CTX-M-2 e CTX-M-97, CTX-M-3 e CTX-M-133 são idênticas (Jacoby; Bush, 2015).

As enzimas CTX-M possuem disseminação em todos os continentes e a mesma já foi identificada tanto em bactérias membros da família *Enterobacteriaceae*, como em isolados clínicos de *P. aeruginosa* (Picão et al., 2009). Estas enzimas conferem resistência às cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos e também são sensível à ação de inibidores de serino β -lactamase.

Acredita-se que as β -lactamases tipo CTX-M foram originadas a partir da enzima cromossômica AmpC de *Kluyvera ascorbata*, devido ao seu alto grau de similaridade. As mesmas são codificadas pelos genes *bla*_{CTX-M}, localizados em plasmídeos, os quais normalmente abrigam outros genes que conferem resistência a outras classes de antimicrobianos, como aminoglicosídeos, cloranfenicol, sulfonamidas, trimetoprim e à tetraciclina e apresentam apenas 40% de similaridade com as β -lactamases TEM e SHV (Bonnet, 2004; Bradford, 2001).

Segundo um estudo de revisão que teve como objetivo verificar a epidemiologia hospitalar de *Enterobacteriaceae* ESBL positivas na América Latina, cerca de 58% dos isolados de *K. pneumoniae* no Brasil são ESBL positivos. Esta taxa é maior do que em outras regiões do mundo (Gusmán-Blanco et al., 2014). De acordo com o mesmo estudo, há um constante aumento na prevalência e tipos de ESBL produzidas por linhagens de *Enterobacteriaceae* isoladas em hospitais América Latina. Destre as ESBL, CTX-Ms são as mais frequentes e parecem apresentar condições endêmicas relacionadas com os surtos clonais (Gusmán-Blanco et al., 2014).

2.2.1.4 METALO- β -LACTAMASES

Carbapenemases pertencentes ao grupo B da classificação de Ambler e ao grupo funcional 3 subgrupo 3a (Tabela 1). A partir de meados da década de 90, as metalo- β -lactamases (MBLs) foram classificadas como um grupo particular de β -lactamases com um largo espectro de atividade, incluindo a hidrólise de carbapenêmicos, droga considerada terapia de escolha para pacientes com infecções hospitalares graves ou para aquelas infecções causadas por microrganismos resistentes às penicilinas e cefalosporinas disponíveis (Gales et al., 2002; Jones et al., 2005). Estas enzimas podem ser codificadas cromossomicamente ou transmitidas através de elementos genéticos móveis (Walsh et al., 2005) e ficaram conhecidas como MBL por fazerem parte do único grupo entre as β -lactamases que necessita de cátions divalentes (Zn^{++}) no seu sítio ativo, para servirem como cofatores enzimáticos no mecanismo de inibição destes antibióticos (Mendes et al., 2006).

A primeira MBL identificada foi descrita em 1966, proveniente de um isolado de *Bacillus cereus*, codificada por gene cromossomal (Hussain et al., 1985; Sabath; Abraham, 1966). Após 25 anos, houve o isolamento da primeira MBL proveniente de um patógeno humano. Esta foi codificada por genes plasmidiais e foi obtida a partir de um isolado de *P. aeruginosa*, ficando esta conhecida como IMP-1 (Osano et al., 1994; Watanabe et al., 1991).

Desde a sua descoberta até o momento, é crescente o número de MBL espalhadas em todo mundo, constituindo um problema de âmbito mundial (Mendes et al., 2006). Atualmente existem doze subclasses de enzimas MBL descritas (Jacoby; Bush, 2015). A tabela 2 descreve os primeiros casos de cada MBL, identificados em patógenos clinicamente importantes. A MBL com o maior número de variantes enzimáticas é a IMP, a qual possui 53 enzimas descritas. Em seguida tem a VIM, com 46 variantes, a NDM com 16, a GIM com duas e as demais com apenas uma enzima descrita por subclasse (Jacoby; Bush, 2015).

No Brasil, a enzima predominante é a SPM-1 (Gales et al., 2003, Silveira et al., 2014). Esta foi caracterizada a partir de uma cepa de *P. aeruginosa* recuperada do trato urinário de uma paciente com leucemia hospitalizada no complexo Hospital São Paulo, em 1997, por isso recebeu o nome de São Paulo metalo- β -lactamase-1 (SPM-1) (Toleman et al., 2002). Segundo González et al (2014), até o presente momento, o gene *bla*_{SPM-1} está associado com um único clone (SP / ST 277) de *P. aeruginosa* disseminado em todo o Brasil (González et al., 2014).

Desde o primeiro caso de identificação do gene *bla*_{SPM-1} fora do Brasil, ocorrido na Suíça (Salabi et al., 2010), poucos relatos foram publicados em outros lugares do mundo, como no México (Quinones-Falconi et al., 2010), na Coréia do Sul (Lee et al., 2012) e no Irã (Ghamgosha et al., 2014), todos relacionados à espécie *P. aeruginosa*. Também no Irã, foi descrito o primeiro relato de *A. baumannii* portador do gene *bla*_{SPM-1}. Neste estudo foram investigados seis isolados portadores do gene e que apresentavam resistência a aztereonam, ceftriaxona, cefepime, ceftazidima, cefixima, cefotaxima, ciprofloxacina, piperacilina, meropenem, imipenem, e piperacilina-tazobactam, demonstrando-se sensíveis apenas a amicacina, colistina e polimixina B (Shahcheraghi et al., 2011).

Tabela 2. Descrição das subclasses de MBL segundo espécie bacteriana, local e ano do primeiro isolamento.

Enzima MBL	Espécie bacteriana (1º isolamento)	Cidade/País	Ano ^a	Referências
IMP-1 (Imipenemase)	<i>P. aeruginosa</i>	Okasaki/ Japão	1991	Osano et al., 1994
VIM-1 (Verona imipenemase)	<i>P. aeruginosa</i>	Verona/ Itália	1997	Lauretti et al., 1999
SPM-1 (São Paulo metalo-β-lactamase)	<i>P. aeruginosa</i>	São Paulo/ Brasil	2001	Toleman et al., 2002
GIM-1 (German imipenemase)	<i>P. aeruginosa</i>	Dusseldorf/ Alemanha	2004	Castanheira et al., 2004
SIM-1 (Seoul imipenemase)	<i>A. baumannii</i>	Seul/ Coréia	2003/ 2004	Lee et al., 2005a
AIM-1 (Australian imipenemase)	<i>P. aeruginosa</i>	Adelaide/ Austrália	2002	Yong et al., 2007
KHM-1 (Kyorin Hospital metalo-β-lactamase)	<i>C. freundii</i>	Toquio/ Japão	1997	Sekiguchi et al., 2008
NDM-1 (New Delhi metallo-β-lactamase)	<i>K. pneumoniae</i>	Nova Deli/ Índia	2008	Yong et al., 2009
DIM-1 (Dutch imipenemase)	<i>P. stutzeri</i>	Amsterdam/ Holanda	2007	Poirel et al., 2010a
SMB-1 (<i>Serratia</i> metallo-β-lactamase)	<i>Serratia marcescens</i>	Toquio/ Japão	2010	Wachino et al., 2011
TMB-1 (Tripoli metalo-β-lactamase)	<i>A. xylosoxidans</i>	Tripoli/ Libia	2011	El Salabi et al., 2012
FIM-1 (Florence imipenemase)	<i>P. aeruginosa</i>	Florença/ Italia	2012	Pollini et al., 2013

Nota: ^aAno = ano do primeiro isolamento; *P. aeruginosa* = *Pseudomonas aeruginosa*, *A. baumannii* = *Acinetobacter baumannii*; *C. freundii* = *Citrobacter freundii*, *K. pneumoniae* = *Klebsiella pneumoniae*; *P. stutzeri* = *Pseudomonas stutzeri*; *S. marcescens* = *Serratia marcescens*; *A. xylosoxidans* = *Achromobacter xylosoxidans*.

2.2.1.5 OUTRAS ENZIMAS β -LACTAMASES

Resistência a β -lactâmicos transmitida por elementos móveis envolve a produção de β -lactamases inativadoras, para os quais várias famílias foram identificadas. As β -lactamases transmitidas por elementos móveis mais comumente encontradas entre isolados de *P. aeruginosa* são pertencentes à classe molecular A das penicilinas serina β -lactamases (PSE, CARB, e as famílias MET). Dentro deste grupo, enzimas pertencentes à família PSE parecem ser as mais prevalentes (Bert; Branger; Lambert-Zechovsky, 2002). O impacto terapêutico dessas penicilinas é relativamente limitado, uma vez que não impactam a eficácia clínica de cefalosporinas de espectro estendido, monobactâmicos ou carbapenêmicos.

Outras β -lactamases de espectro estendido (ESBL) de classe A são as enzimas das famílias SHV, PER, VEB, GES, e IBC, as quais são mais comumente detectadas em bactérias da família *Enterobacteriace*, embora tenha sido identificada em isolados clínicos de *P. aeruginosa*, em menor frequência (Castanheira et al., 2004; Woodford, et al., 2008; Picão et al., 2009).

As oxacilinas (OXA) são β -lactamases pertencentes à classe D, a qual se subdivide em três subclasses: 2d, que confere resistência a cloxacilina; 2de que confere resistência às cefalosporinas de espectro estendido e 2df (Tabela 1), que confere resistência aos carbapenêmicos (Bush; Jacoby 2010). As que exibem atividade carbapenemase são frequentemente encontradas em *Acinetobacter* spp. e *P. aeruginosa*, embora haja crescentes relatos de *Enterobacteriaceae*, em particular, *K. pneumoniae* (Walther-Rasmussen; Høiby, 2007; Mugnier et al., 2010). O nível de atividade carbapenemase exibida pelas OXAs é consideravelmente mais fraco, quando comparado à atividade hidrolítica das MBLs, e isolados que exibem as oxacilinas requerem mecanismos adicionais de resistência para causar um aumento da CIM dos carbapenêmicos (Towner; Lvi; Vlassiadi, 2008).

2.6 PESQUISA DE GENES DE RESISTÊNCIA AOS β -LACTÂMICOS EM PACIENTES COM CÂNCER

Estudos demonstram que o uso indiscriminado de antibióticos em pacientes com câncer tem mudado o perfil epidemiológico das bacteriemias, principalmente nos pacientes neutropênicos (Bow, 2011; Montassier et al., 2013; Gudiol et al., 2013). Bactérias Gram-negativas produtoras de β -lactamase de espectro estendido e outras bactérias MDR tais como *A. baumannii*, *K. pneumoniae* KPC-positiva, *P. aeruginosa*, e *E. coli* resistentes a fluoroquinolona têm sido encontradas (Quilty et al, 2009; Satlin et al, 2013; Bow, 2013).

Chandra e Goswami (2014) detectaram os genes *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV} em 156 isolados clínicos de *E.coli* (n=80) e *K. pneumoniae* (n=76) produtoras de ESBL isoladas de pacientes com câncer internados em um Hospital especializado.

Um estudo prospectivo observacional foi conduzido em 200 leitos de pacientes com câncer internados em um hospital localizado em Barcelona-Espanha com o intuito de avaliar a epidemiologia molecular e fatores de risco em bacteriemias tendo como agente causal *E. coli* ESBL positiva. A aquisição de ESBL estava associada à prévia antibiótico terapia. Em pacientes neutropênicos, bacteriemias causadas por esse patógeno estavam associadas a uma alta taxa de mortalidade (Carlota et al. 2010).

Infecções também são as maiores causas de mortalidade em crianças portadoras de neoplasia. Quiles e colaboradores (2015) utilizaram PCR (Polymerase chain reaction) em tempo real para identificar os principais patógenos causadores de septicemia em pacientes tratados no Instituto Oncológico Pediátrico (IOP) – GRAACC-UNIFESP. Apesar dos genes *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} e *bla*_{SHV} não terem sido encontrados, foram detectados nas amostras sanguíneas os genes *mecA* e *vanB*.

Na mesma instituição pediátrica do estudo acima, Fernandes et al. (2010) avaliaram a prevalência e a disseminação de amostras de *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos e produtoras de MBL isoladas de hemoculturas entre os anos de 2000 a 2005. De 56 amostras de *P. aeruginosa*, isoladas de 49 pacientes, 32 foram positivas para MBL através de testes fenotípicos e destes 18 evidenciaram o gene *bla_{SPM-1}*. Nos pacientes com bacteriemia causada por *P. aeruginosa bla_{SPM-1}*-positivas, a terapêutica antimicrobiana foi considerada adequada em apenas 23,5% e letalidade foi de 70,6% no período de até 30 dias após o início da bacteriemia, tratada com esquema de antimicrobianos inadequados.

2.7 TIPAGEM BACTERIANA

Conhecer a epidemiologia das IRAS é uma ferramenta potente na identificação de possíveis surtos de bactérias intra e inter-hospitalar (Wang et al., 2007). Para tanto, são utilizados métodos de tipagem bacteriana, que podem ser divididos em duas categorias: fenotipagem e genotipagem. Os métodos de fenotipagem auxiliam na identificação do cenário epidemiológico de infecções na fase aguda e no monitoramento da resistência a antimicrobianos (Olge, et al., 1987; Ojeniyi, et al., 1994), enquanto que os métodos de genotipagem, também conhecidos como tipagem molecular, permitem o mapeamento da dinâmica de transmissão da infecção por meio da identificação de semelhança genética entre os isolados (Spacov, et al., 2006; Hafiane; Ravaoarinoro, 2008).

Investigações de surtos de doenças infecciosas tem mostrado que, frequentemente, estes eventos apresentam relação com a exposição a um agente etiológico de origem comum, cujos descendentes são microrganismos relacionados clonalmente, ou seja, são geneticamente idênticos ou estritamente relacionados, logo, pertencem a uma mesma espécie e apresentam fatores de virulência e características bioquímicas semelhantes entre si (Pfaller et al., 2001).

Porém, durante as replicações bacterianas podem ocorrer mutações aleatórias não letais que levam ao surgimento de uma diversidade de características dentro de uma mesma espécie (subtipos ou linhagens), reduzindo o poder de reconhecimento da relação entre linhagens geneticamente semelhantes por meio dos métodos de fenotipagem (Olive; Bean, 1999; Arbeit, 1999, Olge, et al., 1987; Ojeniyi, et al., 1994; Speert, 2002). Por outro lado, favorece a aplicação de métodos de genotipagem, que são caracterizados pelo seu elevado poder discriminatório e de reprodutibilidade (Hafiane; Ravaoarinoro, 2008).

Segundo Hafiane & Ravaoarinoro (2008), os métodos de genotipagem são divididos em dois grandes grupos:

- Métodos baseado na utilização de enzimas de restrição sem amplificação do ácido nucléico, como a Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (Pulsed-Field Gel Electrophoresis - PFGE), Polimorfismo no Tamanho dos Fragmentos de Restrição (Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLP) e a ribotipagem;

- Métodos baseado na amplificação de ácidos nucléicos pela PCR, como o Polimorfismo do DNA Amplificado Aleatoriamente (Random-Amplified Polymorphic DNA - RAPD), PCR Baseada em Elementos de Repetição (Repetitive Element-Based PCR - REP-PCR), Tipagem de Sequência Multilocus (Multilocus-Sequence Typing - MLST), a PCR-Ribotipagem e Sequências Consensuais Intergênicas Repetitivas de Enterobacterias baseada em PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-based PCR - ERIC-PCR).

Dentre estes métodos, PFGE é considerada padrão ouro, devido a sua excelente capacidade discriminatória (Pfaller et al., 2001, Tenover et al., 1995). No entanto, este método apresenta como desvantagens o alto custo e longo período de processamento da amostra, podendo levar vários dias para a sua execução; além do fato de algumas cepas bacterianas não podem ser tipadas através do PFGE, devido à degradação do DNA (Sader et al., 1995; Silbert et al., 2003).

Em contrapartida, a técnica de ERIC-PCR tem se apresentado com boa alternativa para fins de vigilância epidemiológica, por apresentar boa eficácia e efetividade, alto poder discriminatório, boa reprodutibilidade, além de ser um método rápido e de menor custo quando comparado a PFGE (Syrmis et al., 2004; Agarwal et al., 2005; Hafiane; Ravaoarinoro, 2008; Pinna et. al., 2008).

Apesar da técnica de ERIC-PCR ter sido inicialmente desenvolvida para tipagem de enterobactérias, estudos de comprovam que a mesma é útil para genotipagem de outros grupos de bactérias, como *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *Anaplasma marginale* e até mesmo protozoários, como a *Babesia bigemina*, *Tripanossoma vivax*, *Leishmania chagasi* dentre outros patógenos humanos (Ferreira et. al., 2001; Ferreira et. al., 2011; Leal, 2010; Madruga et. al., 2002; Motta, 2006; Osório, 2002).

Diante do exposto, a diversidade de patógenos e de fatores associados a IRAS em pacientes com câncer, bem como de genes de resistência envolvidos neste processo, incentiva a realização de estudos epidemiológicos com o objetivo de verificar as características das infecções, de forma a traçar o perfil das IRAS nessa população, e assim, oferecer melhor assistência aos pacientes.

3. Objetivos

3.1 OBJETIVO GERAL

Pesquisar os genes *bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} e o perfil clonal de isolados provenientes de infecção relacionada à assistência a saúde ocasionadas por *Klebsiella* spp., *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. em pacientes com neoplasias sólidas, bem como investigar as características relacionadas ao paciente, à hospitalização e à infecção destes pacientes, internados em um hospital situado em Recife, Pernambuco/Brasil no período entre novembro de 2012 e abril de 2014.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o perfil de resistência aos antimicrobianos e a frequência dos genes *bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M} nos isolados de *Klebsiella* spp., *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp.
- Investigar o perfil clonal dos isolados bacterianos multidroga resistentes.
- Investigar as características relacionadas ao paciente, à hospitalização e à infecção.
- Verificar possíveis associações entre as características clínicas, microbiológicas e epidemiológicas e o perfil de multirresistência dos patógenos.

4. Metodologia

4.1 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo descritivo do tipo corte transversal, onde foram investigados dados relacionados ao paciente, à hospitalização e à infecção em pacientes com neoplasias sólidas que desenvolveram infecção relacionada à assistência à saúde (IRAS) ocasionadas por *Klebsiella* spp., *P. aeruginosa*, e *Acinetobacter* spp., no período de novembro de 2012 a abril de 2014.

4.2. LOCAL DO ESTUDO

O estudo epidemiológico foi desenvolvido em um hospital especializado em pacientes com câncer, situado em Recife/Pernambuco, Brasil. O mesmo oferece serviços de urgência 24 horas, Unidade de Terapia intensiva (UTI), oncologia médica, oncologia cirúrgica, além de quimioterapia, radioterapia, radiologia, odontologia e departamento de próteses reabilitadoras. O mesmo tem a capacidade para atender cerca de 55% de todos os pacientes oncológicos de Pernambuco.

As análises microbiológicas e moleculares de resistência aos antimicrobianos foram realizadas no Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular, Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), e o sequenciamento genético foi realizado na Plataforma de Sequenciamento de DNA, Laboratório de Genética Molecular Humana- LGMH, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

4.3. POPULAÇÃO-ALVO

A população do estudo foi constituída por pacientes com neoplasias, de ambos os sexos e todas as idades, admitidos no hospital do estudo no período de novembro de 2012 e abril de 2014, e que desenvolveram IRAS causada por *Klebsiella* spp., *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp.

Destaca-se que no período do estudo, o hospital atendia exclusivamente pacientes com neoplasias sólidas, por este motivo este trabalho tem como foco este grupo de pacientes.

4.4. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos no estudo todos os pacientes que desenvolveram infecção causada por *Klebsiella* spp., *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. após 48 horas de internamento, de acordo com o diagnóstico dos médicos assistentes que acompanharam cada caso.

4.5. TAMANHO AMOSTRAL

Uma amostra mínima de 124 isolados bacterianos, provenientes de infecção, foi obtida utilizando o software estatístico Epi-Info (v. 7). Para o cálculo do tamanho amostral foi utilizando como estimativa de população sob risco o número de internações por câncer no Brasil, no período de 2008 a 2012 (SIH-SUS) e como estimativa de prevalência de infecções por bacilos Gram-negativos em pacientes com câncer baseada no estudo de Costa, Atta e Silva (2015) e intervalo de confiança de 90%.

4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram conduzidas utilizando o software Epi-Info (v. 7). A descrição da amostra foi feita por meio de cálculo de frequência com intervalo de confiança de 95% (IC95%) para as variáveis categóricas e de mediana para as variáveis numéricas. Enquanto que a verificação de possíveis fatores associados à infecção por patógenos MDR foi investigada utilizando teste do qui-quadrado ou teste exato de Fisher para as variáveis categóricas e teste U de Mann-Whitney para as variáveis numéricas, devido a não distribuição normal das mesmas. Foram consideradas estatisticamente significativas as associações com p-valores $\leq 0,05$.

4.7. DEFINIÇÃO DE TERMOS

Infecção relacionada à saúde foi definida como o isolamento de um dos patógenos da pesquisa (*P. aeruginosa* ou *Klebsiella* spp. ou *Acinetobacter* spp.), na presença de sinais ou sintomas clínicos compatíveis, 48 horas após o internamento no hospital. O diagnóstico da infecção foi realizado pelo médico assistente seguindo os critérios estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC), e para a presente pesquisa, a informação foi colhida no prontuário clínico.

4.8. DEFINIÇÃO DAS VARIÁVEIS DO ESTUDO

a) Variáveis relacionadas ao paciente:

- Idade: Variável temporal, considerada a idade em anos completos no dia do diagnóstico da infecção. A idade foi calculada com base na data de nascimento, informada no prontuário clínico. Variável discreta.

- Sexo: Categorizado como 1. Masculino, 2. Feminino.

b) Variáveis relacionadas à hospitalização:

- Tipo de neoplasia sólida: tipo de câncer que levou o paciente ao internamento, informado no prontuário clínico. Categorizado como 1. Câncer de intestino, cólon e reto, 2. Câncer de mama, 3. Câncer de próstata, 4. Câncer de laringe, 5. Câncer cerebral, 6. Câncer de colo de útero e ovário, 7. Câncer de bexiga, 8. Câncer de pulmão, 9. Câncer de estômago, 10. Cânceres ósseos, 11. Câncer de boca e lábio, 12. Outros tipos de neoplasia sólida.

- Metástase: Disseminação do câncer primário para outros órgãos. Categorizada como 1. Sim, 2. Não.

- Tipo de Metástase: Classificação baseada no órgão alvo da disseminação do câncer. Categorizado como 1. Ossos, 2. Tireoide, 3. Fígado, 4. Pulmão, 5. Cérebro, 6. Linfonodos auxiliares, 7. Ausência de metástase.

- Período de Internação: Intervalo de tempo em dias, transcorridos desde a admissão no hospital até o surgimento da infecção por *Klebsiella* spp., *P. aeruginosa* ou *Acinetobacter* spp.. Variável discreta.

- Local de internamento: Setor do hospital cujo paciente estava internado durante o isolamento do patógeno. Categorizado como 1. UTI, 2. Oncologia Médica, 3. Oncologia Cirúrgica, 4. Cuidados Paliativos.

- Uso de corticoide antes do isolamento do patógeno: Informação colhida no prontuário clínico. Categorizado como 1. Sim, 2. Não.

- Tempo de duração do tratamento com corticoide: Intervalo de tempo em dias, em que o paciente fez uso de corticoide, até três meses antes do isolamento do patógeno. Variável discreta.

- Uso de antimicrobianos até três meses antes: Utilização de antimicrobianos nos últimos 3 meses anteriores ao isolamento do patógeno. Informação colhida no prontuário clínico. Categorizado como 1. Sim, 2. Não. Se sim, o nome do antimicrobiano utilizado.

- Uso de antimicrobianos durante o internamento e antes do isolamento do patógeno incluído nesta pesquisa: Utilização de algum antimicrobiano durante o internamento em questão, porém em período anterior ao isolamento do patógeno da pesquisa. Informação colhida no prontuário clínico. Categorizado como 1. Sim, 2. Não. Se sim, qual o nome do antimicrobiano utilizado.

- Uso de antimicrobianos no tratamento da infecção causada pelo patógeno incluído nesta pesquisa: utilização de antimicrobianos no tratamento da infecção ocasionada por um dos patógenos investigados neste estudo. Informação colhida no prontuário clínico. Categorizado como 1. Sim, 2. Não. Se sim, qual o nome do antimicrobiano utilizado.

- Adequação do tratamento: Verificado por meio da comparação entre o tratamento antimicrobiano utilizado e o perfil de susceptibilidade do patógeno. Categorizado como 1. Adequado, 2. Inadequado.

* O tratamento foi considerado adequado quando o patógeno tratado apresentava sensibilidade ao antimicrobiano utilizado no tratamento e considerado inadequado quando o mesmo apresentava resistência ao antimicrobiano utilizado no tratamento.

- Tipo de terapia: Considerado de acordo com o número de antimicrobianos utilizados no tratamento do patógeno. Categorizado como 1. Monoterapia, 2. Terapia combinada, 3. Não tratamento (no caso dos pacientes que foram a óbito antes do início do tratamento).

- Evolução clínica: Informação colhida no prontuário clínico. Categorizada como 1. Alta hospitalar, 2. Óbito, 3. Permaneceu internado após cura da infecção.

- Óbito relacionado ao quadro infeccioso investigado: Informação colhida no prontuário clínico, através das causas do óbito descritas na declaração de óbito. Categorizado como 1. Sim, 2. Não, 3. Não se aplica.

* Aplicação de procedimentos invasivos

- Ventilação mecânica: Uso de assistência ventilatória mecânica invasiva durante o internamento e até o isolamento do patógeno. Categorizado como 1. Sim, 2. Não.

- Acesso venoso central: Presença de cateter venoso central introduzido durante o internamento e até o isolamento do patógeno. Categorizado como 1. Sim, 2. Não.

- Acesso venoso periférico: Presença de cateter venoso periférico introduzido durante o internamento e até o isolamento do patógeno. Categorizado como 1. Sim, 2. Não.

- Sonda vesical de demora: Presença de cateter vesical de demora em trato urinário introduzido durante o internamento e até o isolamento do patógeno. Categorizado como 1. Sim, 2. Não.

- Cirurgia: Realização de procedimento cirúrgico durante o internamento e até o isolamento do patógeno. Categorizado como 1. Sim, 2. Não.

- Tempo pós-operatório até isolamento do patógeno: Intervalo de tempo em dias, transcorridos desde a data da cirurgia até o isolamento do patógeno. Variável discreta.

c) Variáveis relacionadas à infecção:

- Bactéria: Patógeno identificado como causador da infecção. Categorizado como 1. *Pseudomonas aeruginosa*, 2. *Acinetobacter* spp., 3. *Klebsiella* spp..

- Multidroga-resistência: Característica relacionada a patógenos resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos (CDC, 2013). Categorizado como 1. MDR, 2. Não MDR.

- Sítio de infecção: Localização da infecção no corpo do paciente. Variável coletada em prontuário clínico. Categorizado como 1. Pulmão, 2. Corrente sanguínea, 3. Sítio Urinário, 4. Sítio Cirúrgico, 5. Pele/tecidos moles, 6. Abdômen, 7. Outros.

- Sítio do material coletado: Tipo de material coletado para cultura bacteriana. Variável coletada no laudo do exame bacteriológico. Categorizado como 1. Aspirado Traqueal, 2. Sangue, 3. Urina, 4. Ponta de cateter venoso central, 5. Outros.

4.9. COLETA DOS DADOS

Após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do hospital do estudo, os dados clínicos e epidemiológicos foram coletados a partir dos prontuários clínicos dos pacientes inseridos na pesquisa, utilizando um formulário específico elaborado pelos pesquisadores (Apêndice A), com o objetivo de padronizar a coleta.

Os dados de identificação bacteriana e o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos foram obtidos a partir dos laudos dos exames bacteriológicos, havendo a complementação de alguns testes de susceptibilidade, quando necessário.

A pesquisa de genes de resistência aos β -lactâmicos foi realizada através da metodologia descrita no item 4.11, no Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular, Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

4.10. AMOSTRA BACTERIANA

Os isolados de *Klebsiella* spp., *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. inseridos na pesquisa foram fornecidos pelos profissionais do laboratório de análises clínicas terceirizado, responsável pelos exames laboratoriais dos pacientes internados no hospital do estudo.

Para garantir a qualidade do estudo, os isolados bacterianos foram re-identificados de acordo com os testes de identificação descritos por Winn et al. (2008), e aqueles que não pertenciam a nenhum dos gêneros/espécie estudados, foram excluídos da amostra.

Os isolados bacterianos foram mantidos em estoque congelado com glicerol 20% a -20°C, para as análises posteriores. E a re-ativação das amostras foi feita em caldo BHI (Brain Heart Infusion) incubados a 37°C por 48h.

4.10.1 Análise do Perfil de Susceptibilidade aos Antimicrobianos

Os testes de susceptibilidade aos antimicrobianos foram realizados pela técnica de difusão de discos em Ágar Mueller-Hinton, e a interpretação segundo os critérios estabelecidos pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2014).

Para *P. aeruginosa* os antibióticos selecionados foram piperacilina-tazobactam, azetreonam, ceftazidima, cefepime, imipenem, meropenem, amicacina, gentamicina e ciprofloxacina.

Para *Acinetobacter* spp. foram selecionados ampicilina-sulbactam, ceftriaxona, ceftazidima, cefepime, imipenem, meropenem, amicacina, gentamicina, ciprofloxacina, trimetoprim-sulfametoxazol e tetraciclina.

E para *Klebsiella* spp. foram selecionados ampicilina, amoxicilina-ácido clavulânico, piperacilina-tazobactam, azetreonam, ceftriaxona, imipenem, meropenem, amicacina, gentamicina, ciprofloxacina, sulfametoxazol-trimetoprim e tetraciclina.

Apenas no isolado de *A. baumannii* portador do gene *bla*_{SPM-1} o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos foi determinado através de concentrações inibitórias mínimas (CMIs) utilizando o sistema automatizado (Vitek2 system; bioMérieux, Hazelwood,

MO, USA), e interpretado segundo critérios do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2014).

4.11. ANÁLISE MOLECULAR DAS AMOSTRAS BACTERIANAS

4.11.1 Extração de DNA total

A extração de DNA total foi realizada utilizando o kit de extração de DNA Brazol (LGC Biotecnologia), através do protocolo fornecido pelo fabricante modificado, conforme esquema abaixo (Figura 1):

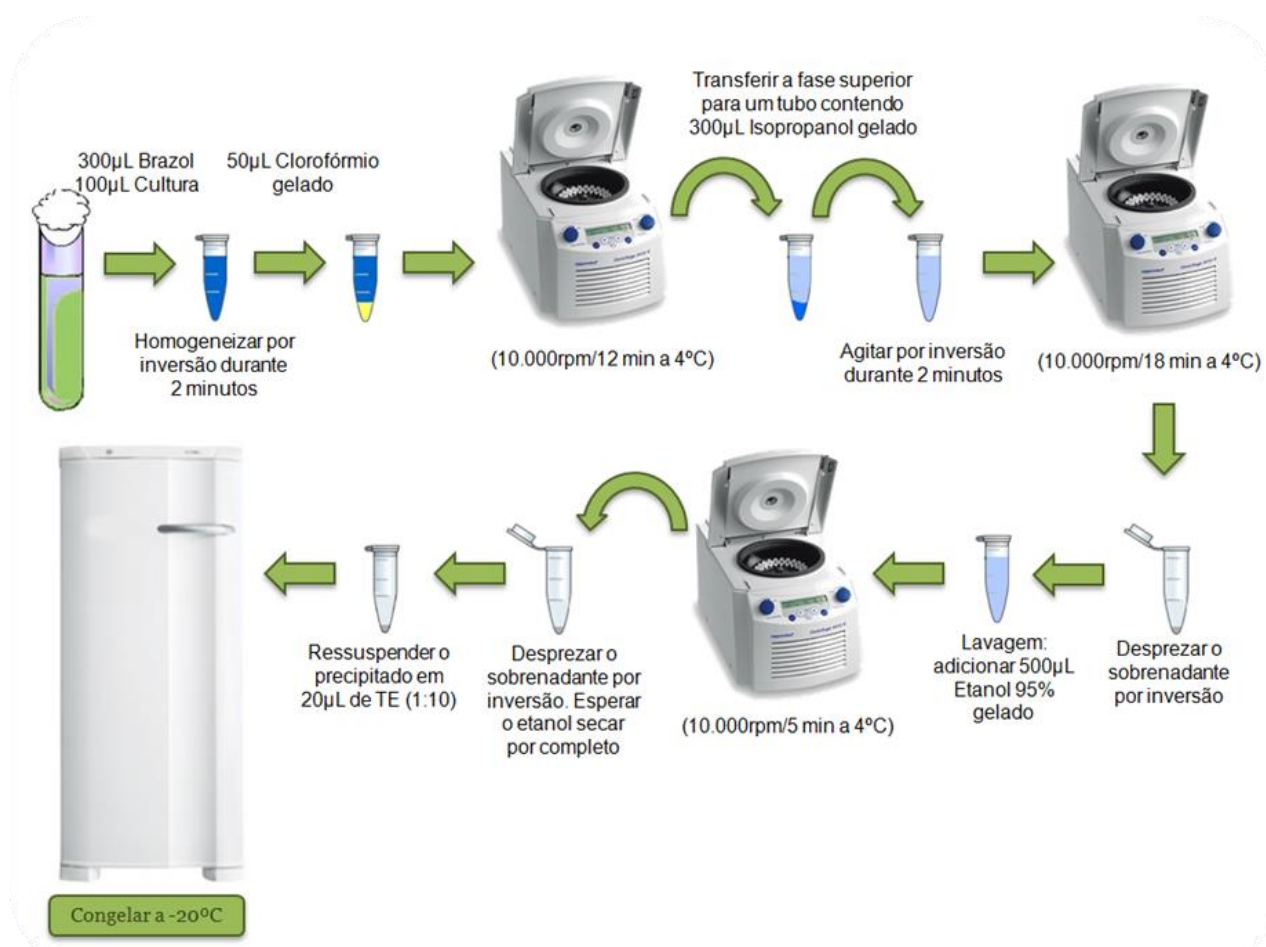


Figura 2. Representação esquemática da técnica de extração de DNA utilizando o Kit de Extração Brazol

Após a extração do DNA bacteriano, os mesmos foram quantificados por espectrofotometria (Ultraspec 3000, Pharmacia Biotech) em uma faixa de comprimento de onda entre 260 a 280nm.

4.11.2 ERIC-PCR

A tipagem molecular foi investigada nos isolados MDR por meio da técnica Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-based PCR (ERIC-PCR), para identificação do perfil clonal dos mesmos.

As reações de ERIC-PCR foram preparadas em um volume total de 25 µL por tubo, compreendendo: 100ng de DNA genômico, 10 pmol dos primers (ERIC-1 [5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3']; ERIC-2 [5'-AAGTAAGTGACTGGGGTG AGCG-3']) (Duan et al., 2009), tampão 1x, 200µM do desoxirribonucleotídeo trifosfato (Promega), 1,5mM de MgCl₂ e 1,0U da enzima *Taq* DNA polimerase (Promega). Os parâmetros de amplificação utilizado na ERIC-PCR foram: desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 92°C por 1 minuto, anelamento a 36°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 8 minutos, seguido de uma extensão final de 16 minutos à 72°C (Duan et al., 2009). Os produtos de PCR foram corados com green (Jena Bioscience) e submetidos à eletroforese a 1,5% em gel de agarose em TBE buffer (Tris-borato 0,089M e EDTA 0,002M) sob voltagem constante de 100V, visualizados sob luz UV e fotodocumentados para posterior análise de perfis clonais. Os padrões de bandas gerados na ERIC-PCR foram analisados de acordo com Tenover et al. (1995) e o software Past.exe foi utilizado para gerar o dendrograma.

4.11.3 Detecção dos genes relacionados à produção de MBL

Os genes MBL (*bla_{SPM-1}*, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*) foram investigados nos isolados de *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. e *Klebsiella* spp. resistentes aos carbapenêmicos. As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 µL por tubo, compreendendo: 25ng de DNA genômico, 10 pmol dos primers (Tabela 3), Tampão 1x, 100µM do desoxirribonucleotídeo trifosfato (Ludwig Biotec), 1,5 mM de MgCl₂ e 1,0U da enzima *Taq* DNA polimerase (Promega). Em cada partida de amplificação foi incluído um controle negativo, constituído de um tubo com todos os componentes da reação ao qual não foi adicionado DNA, e um controle positivo para cada gene: *bla_{SPM-1}* (*P. aeruginosa* PSA319), *bla_{IMP}* (*P. aeruginosa* 48–1997A) e *bla_{VIM}* (*P. aeruginosa* VIM-1) fornecido pelo Laboratório Alerta, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

As amplificações dos genes *bla_{SPM-1}*, *bla_{IMP}* e *bla_{VIM}* foram realizadas nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento segundo temperatura descrita na Tabela 2 por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, e depois uma extensão final de 10 minutos a 72°C (Gales et al., 2003). Os produtos de PCR foram corados com blue (Jena Bioscience) e submetidos à eletroforese a 1,0% em géis de agarose em TBE buffer (Tris-borato 0,089M e EDTA 0,002M) sob voltagem constante de 100V, visualizados sob luz UV e fotodocumentados.

Tabela 3. Relação dos primers e temperatura de anelamento para a pesquisa de genes de MBL

Gene	Primers	Temperatura de anelamento
<i>bla</i> _{IMP-DIA} ^a	F(5' GGAATAGAGTGGCTTAATTCTC 3') R(5' GTGATGCGTCYCCAAYTTCACT 3')	50,6°C
<i>bla</i> _{VIM-DIA} ^a	F (5'CAGATTGCCGATGGTGTTTGG 3') R (5'AGGTGGGCCATTTCAGCCAGA 3')	56,8°C
<i>bla</i> _{SPM-1} ^b	F(5' CCTACAATCTAACGGCGACC 3') R(5' TCGCCGTGTCCAGGTATAAC 3')	55,3°C

Fontes: ^a Dong et al., 2008; ^b Gales et al., 2003

4.11.4 Detecção de genes *bla*_{KPC}

As amostras de *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. e *Klebsiella* spp. resistentes aos carbapenêmicos, bem como as resistentes às cefalosporinas de terceira e quarta geração, foram submetidas à pesquisa de genes de resistência *bla*_{KPC} segundo metodologia descrita por Yigit *et al.* (2001). As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 µL por tubo, compreendendo: 5ng DNA genômico, 10 pmol dos primers ([5'-TGTCAGTGTATCGCCGTC-3'] e [5'-CTCAGTGCTCTACAGAAAACC-3']); 2,0U da enzima *Taq* DNA polimerase (Promega), 200µM do desoxirribonucleotídeo trifosfato (Ludwig Biotec) e 1,5 mM de MgCl₂. Em cada partida de amplificação foi incluído um controle negativo, constituído de um tubo com todos os componentes da reação ao qual não foi adicionado DNA, e um controle positivo (*P. aeruginosa* P22A), pertencente à coleção de cultura do Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular, Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Os parâmetros de amplificação utilizados foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, seguido de uma extensão final de 10 minutos à 72°C. Os produtos de PCR foram corados com blue (Jena Bioscience) e submetidos à eletroforese a 1,0% em géis de agarose em TBE buffer (Tris-borato 0.089M e EDTA 0,002M) sob voltagem constante de 100V, visualizados sob luz UV e fotodocumentados.

4.11.5 Detecção de genes *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M}

Nos isolados *P.aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. e *Klebsiella* spp. resistentes às cefalosporinas de terceira e quarta geração, foi investigado o gene β -lactamase *bla*_{TEM}, e apenas nos isolados de *Klebsiella* spp. com a mesma característica supracitada, foi investigado gene da β -lactamases de espectro estendido (ESBL) *bla*_{CTX-M}.

As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 μ L por tubo, compreendendo: 10ng de DNA genômico, 25 pmol dos primers (Tabela 4), Tampão 1x, 200 μ M do desoxirribonucleotídeo trifosfato (Ludwig Biotec), 1,5 mM de MgCl₂ e 2,0U da enzima *Taq* DNA polimerase (Promega) (Cabral et al., 2012, Saladin et al 2002). Em cada partida de amplificação foi incluído um controle negativo, constituído de um tubo com todos os componentes da reação ao qual não foi adicionado DNA, e um controle positivo para cada gene: *bla*_{TEM} (*P. aeruginosa* P14HC) e *bla*_{CTX-M} (*Enterobacter cloacae* Ec1A), pertencentes à coleção de cultura do Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular, Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

As amplificações dos genes *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M} foram realizadas nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento segundo temperatura descrita na Tabela 4 por 1 minuto e

extensão a 72°C por 1 minuto, e depois uma extensão final de 10 minutos a 72°C (Cabral et al., 2000, Saladin et al., 2002). Os produtos de PCR foram corados com blue (Jena Bioscience) e submetidos à eletroforese a 1,0% em géis de agarose em TBE buffer (Tris-borato 0.089M e EDTA 0.002M) sob voltagem constante de 100V, visualizados sob luz UV e fotodocumentados.

Tabela 4. Relação dos primers e temperatura de anelamento para a pesquisa de genes *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M}

Gene	Primers	Temperatura de anelamento
<i>bla</i> _{TEM} ^a	F(5' ATAAAATTCTTGAAGACGAAA 3')	57,0°C
	R(5' GACAGTTACCAATGCTTAATC 3')	
<i>bla</i> _{CTX-M} ^b	F(5' SCSATGTGCAGYACCAGTAA 3')	61,0°C
	R(5' CCGCRATATGRTTGGTGGTG 3')	

Fontes: ^a Cabral et al., 2012; ^b Saladin et al., 2002.

4.11.6 Detecção do gene *bla*_{OXA-51-tipo}

O gene β -lactamase *bla*_{OXA-51-tipo} foi investigado apenas no isolado de *Acinetobacter* spp. portador do gene *bla*_{SPM-1} identificado neste estudo, a título de confirmação da espécie *Acinetobacter baumannii*.

A reação de amplificação foi preparada em um volume total de 25 μ L, compreendendo: 10ng de DNA genômico, 25 pmol dos primers (F - [5'- TAATGC TTTGATCGGCCTTG -3']; R [5'- TGGATTGCACTTCATCTTGG -3']) (Woodford et al., 2006), tampão 1x, 0,8mM do desoxirribonucleotídeo trifosfato (Promega), 1,5mM de MgCl₂ e 1,25 U da enzima *Taq* DNA polimerase (Promega) (Brown; Young; Amyes, 2005). Os parâmetros de amplificação utilizado na ERIC-PCR foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 25 segundos, anelamento a 52°C por 40 segundos e extensão a 72°C por 50 segundos, seguido de uma extensão final de 6 minutos à 72°C (Woodford et al., 2006).

Os produtos de PCR foram corados com blue (Jena Bioscience) e submetidos à eletroforese a 1,0% em géis de agarose em TBE buffer (Tris-borato 0.089M e EDTA 0.002M) sob voltagem constante de 100V, visualizados sob luz UV e fotodocumentados.

4.12. LIMITAÇÕES METODOLÓGICAS DO ESTUDO

O estudo descritivo das características relacionadas ao paciente, à hospitalização e à infecção tomou como base os dados coletados no prontuário clínico, logo, uma limitação metodológica inerente é o viés de informação, podendo ocorrer ausência de informações necessárias para a pesquisa ou mesmo despadronização de informações. Para minimizar falhas na coleta, foi aplicado o formulário da pesquisa permitindo assim a padronização das informações coletadas.

Outro problema enfrentado foi o viés de classificação, uma vez que o processamento das amostras no laboratório terceirizado é todo manual, tendo ocorrido o envio de isolados pertencentes a outros gêneros/espécies diferentes dos que compõem o estudo. Este viés foi minimizado através de uma re-identificação dos isolados no Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular, Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Da mesma forma o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, realizado pelo laboratório terceirizado, apresentou grande variação na seleção dos fármacos testados. Para minimizar este viés, foram definidos os antimicrobianos testados por gênero/espécie e foi realizada a complementação dos testes necessários. No entanto, não foi possível complementar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos em todos os isolados, por isso, priorizou-se a complementação dos testes nos isolados MDR.

4.13 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este trabalho foi submetido à aprovação nos Comitês de Ética em Pesquisa interno do hospital onde o estudo foi realizado, conforme as normas da Resolução do Conselho Nacional de Saúde/ CNS número 196/96, a qual estabelece as diretrizes e normas reguladoras de pesquisas envolvendo seres humanos. O mesmo foi aprovado pelo comitê de ética e pesquisa com seres humanos do Hospital do Câncer de Pernambuco (CAAE 05554812.7000.5205).

Está sendo assegurada a confidencialidade e sigilo das informações individuais dos participantes da pesquisa, não sendo possível identificação dos mesmos, uma vez que os resultados do estudo foram tratados estatisticamente e informados por meio de frequências e medianas. As informações analisadas foram utilizadas para fins estritamente acadêmicos científicos e será feita a prestação de contas ao hospital do estudo, com o intuito de contribuir para construção e implementação das políticas de vigilância epidemiológica hospitalar.

5. Resultados

5.1 Primeiro relato de *bla*_{SPM-1} em *Acinetobacter baumannii* no Brasil

Introdução

Nas últimas décadas, *Acinetobacter baumannii* multirresistente (MDR) tem sido associado a um amplo espectro de infecções relacionadas à assistência a saúde, apesar de apresentar baixa virulência. Por este motivo, vem sendo considerado um patógeno emergente, responsável por infecções hospitalares e comunitárias, apresentando dificuldades na condução do seu tratamento (Kempf; Rolain, 2014). Apesar da baixa frequência em *Acinetobacter* spp., a produção de metalo- β -lactamase (MBL) consiste em um mecanismo de resistência importante. Este geralmente está associado à patógenos MDR, conferindo resistência à maioria dos β -lactâmicos, devido à sua potente atividade carbapenemase e resistência a inibidores de β -lactamase (clavulanato e sulfonas) (Cornaglia; Giamarellou; Rossolini, 2011).

Paciente e Métodos

Trata-se do primeiro relato do gene *bla*_{SPM-1} em *Acinetobacter baumannii* no Brasil, isolado em janeiro de 2014. A bactéria foi isolada de uma amostra de secreção traqueal de uma paciente em tratamento de um câncer de mama estágio III, internada na unidade de terapia intensiva (UTI) de um hospital em Recife, Pernambuco, Brasil. Após a identificação da espécie, foi analisado o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e determinadas as concentrações inibitórias mínimas (CMIs) utilizando o sistema automatizado (Vitek2 system; bioMérieux, Hazelwood, MO, USA), e interpretado segundo critérios do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2014). A espécie de *Acinetobacter* foi identificada através do sistema Vitek2, e confirmada por PCR (Polymerase chain reaction) do gene *bla*_{OXA-51-tipo} (Woodford et al., 2006).

Em seguida, os genes foram testados utilizando primers específicos: *bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{TEM} (Cabral et al., 2012) e um controle positivo para cada gene foi utilizado: *bla*_{SPM-1} (*P. aeruginosa* PSA319), *bla*_{IMP} (*P. aeruginosa* 48-1997A) and *bla*_{VIM} (*P. aeruginosa* VIM-1) fornecidas pelo Laboratório Alerta, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP); *bla*_{KPC} (*P. aeruginosa* P22A) and *bla*_{TEM} (*P. aeruginosa* P14HC), pertencentes a coleção de cultura do Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular, Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Resultados

O teste de susceptibilidade por concentração inibitória mínima mostrou que o isolado exibiu fenótipo MDR (Tabela 1). O *A. baumannii* mostrou-se resistente às penicilinas (ampicilina, amoxicilina-sulbactam, piperacilina-tazobactam), cefalosporinas (ceftazidima, ceftriaxona, cefepime), carbapenêmicos (imipenem e meropenem) e quinolonas (ciprofloxacina). Entretanto, o mesmo apresentou-se sensível aos aminoglicosídeos (amicacina e gentamicina), glicilciclina (tigeciclina) e a polimixina (colistina).

Vale destacar que, um mês antes do isolamento do *Acinetobacter*, a paciente teve outro episódio de infecção a qual foi tratada por meio de terapia sequencial com piperacilina-tazobactam, e associação de meropenem, amicacina e teicoplanina. Porém a paciente morreu um dia após a coleta da secreção traqueal que resultou no isolamento do *A. baumannii* descritos neste relato. A causa básica do óbito foi choque séptico de sítio pulmonar.

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (CIM) do *Acinetobacter baumannii* portador do gene *bla*_{SPM-1}.

Antibiotic	CIM (mg/mL)
Ampicilina	≥ 32
Amoxicilina-sulbactam	16
Piperacilina-tazobactam	≥ 128
Ceftazidima	≥ 64
Ceftriaxona	≥ 64
Cefepime	32
Imipenem	≥ 16
Meropenem	≥ 16
Amicacina	≤ 2
Gentamicina	≤ 1
Ciprofloxacina	≥ 4
Tigeciclina	1
Colistina	≤ 0,5

Apenas o gene *bla*_{SPM-1} foi amplificado. O amplicon foi sequenciado e a sequência da proteína codificada foi determinada utilizando BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e Clustal W (<http://www.cbi.ac.uk/>). Esta análise confirmou que amplicon é o gene *bla*_{SPM-1} (GenBank número de acesso KR185964), com homologia de 100% em relação ao AJ492820.1 (número de acesso no GenBank) (Toleman et al., 2002).

Discussão

O achado sugere transmissão interespecie, porque no Brasil este gene só foi detectado em *P. aeruginosa* (González et al., 2014). Curiosamente, apesar do gene *bla*_{SPM-1} estar ligado a resistência em *P. aeruginosa* e sua disseminação estar quase que restrita ao Brasil, o mesmo foi identificado em isolados de *A. baumannii* no Irã (Shahcheraghi et al., 2011), Índia (Azim et al., 2010), e na Arábia Saudita (Al-Sultan, 2014). Destes, apenas no estudo do Irã foi feito o sequenciamento do amplicon e o mesmo foi submetido ao GenBank, além de ser o único país, dentre estes, com caso de *bla*_{SPM-1} em *P. aeruginosa* publicado (Ghamgosha et al., 2014). Frente a gravidade da ocorrência de disseminação de cepas MDR e de genes de resistência em *Acinetobacter baumannii*, em unidades hospitalares no mundo inteiro, ressalta-se a importância da vigilância contínua de bactérias MDR no ambiente hospitalares. Também se faz necessária adoção de medidas de controle mais efetivas, buscando minimizar a disseminação destes patógenos, tais como a adesão aos protocolos de higiene das mãos e descontaminação dos equipamentos, instrumentos e do ambiente hospitalar.

Referências

1. Kempf M, Rolain J M. Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. International Journal of Antimicrobial Agents 2014; **39**:105-14.
2. Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams? The Lancet Infectious Diseases 2011; **11**:381-93.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility. Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. CLSI document M100-S24. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. **2014**.

4. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, Amyes SG, Livermore DM. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp.. International Journal of Antimicrobial Agents 2006; **27**:351-3.
5. Cabral AB, Melo RCA, Maciel MAV, Lopes ACS. Multidrug resistance genes, including blaKPC and blaCTX-M-2, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 2012; **45**:572-8.
6. Toleman, M. A.; Simm, A. M.; Murphy, T. A.; Gales, A. C.; Biedenbach, D. J.; Jones, R. N.; Walsh, T. R. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2002; **50**:673-9.
7. González LJ, Moreno DM, Bonomo RA, Vila1 AJ. Host-specific enzyme-substrate interactions in SPM-1 metallo- β -Lactamase are modulated by second sphere residues. PLoS Pathog 2014; **10**: e1003817.
8. Shahcheraghi F, Abbasalipour M, Feizabadi M, Ebrahimipour G, Akbari N. Isolation and genetic characterization of metallo- β -lactamase and carbapenamase producing strains of *Acinetobacter baumannii* from patients at Tehran hospitals. Iranian Journal of Microbiology 2011; **3**:68-74.
9. Azim A, Dwivedi M, Rao PB, Baronia AK, Singh RK, Prasad KN, Poddar B, Mishra A, Gurjar M, Dhole TN. Epidemiology of bacterial colonization at intensive care unit admission with emphasis on extended-spectrum β -lactamase- and metallo- β -lactamase-producing Gram-negative bacteria—an Indian experience. Journal of Medical Microbiology 2010; **59**:955-60.
10. Al-Sultan AA. Diabetic patients are threatened by “superbugs” *Acinetobacter baumannii* In Saudi Arabia. Int J Infect Dis 21:351. In 16th International Congress on Infectious

Diseases (ICID), Local Organizing Committee and Federation of Infectious Diseases Societies of Southern Africa (FIDSSA), Cape Town, South Africa. **2014.**

11. Ghamgosha M, Zahedani SS, Kafilzadeh F, Bameri Z. Metallo-Beta-lactamase genes VIM-1, SPM-1 and IMP-1 in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Zahedan Hospitals. International Journal of Infectious Diseases 2014; **1**:e19635.

5.2 Detecção de genes *bla*_{SPM-1}, *bla*_{KPC}, *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M} em isolados de *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. e *Klebsiella* spp. provenientes de pacientes oncológicos com infecções relacionadas à assistência à saúde

Introdução

As infecções bacterianas permanecem como causa significativa de mortalidade e morbidade entre pacientes com câncer com ou sem neutropenia, apesar dos avanços na antibioticoterapia ocorridos nas últimas décadas (Pongas et al., 2012; Wang et al., 2011). A frequência e gravidade das infecções podem estar relacionadas à utilização de medicamentos citotóxicos potentes e ferramentas diagnósticas cada vez mais invasivas (Maschmeyer & Haas 2008; Wang et al., 2011).

Diante desta vulnerabilidade apresentada pelo paciente com câncer, esta população é mais susceptível às infecções comunitárias e relacionadas à assistência à saúde (IRAS). De acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), um a cada 25 pacientes hospitalizados (4,0%; IC_{95%} 3,7 a 4,4) está enfrentando uma IRAS, definida como infecção adquirida em hospital ou unidade de serviço a saúde, após 48 horas de internamento ou no prazo de 30 dias após a alta hospitalar (Revelas, 2012, Magill et al., 2014). Outro motivo de preocupação, em vários centros de atendimento a pacientes com câncer, tem sido as altas taxas de resistência bacteriana e a ascensão dos patógenos oportunistas também multidroga-resistentes (MDR), isto é, aqueles resistentes a três ou mais classe de antimicrobianos (CDC, 2013; Fukuta et al., 2013; Marín et al., 2014; Pongas et al., 2012).

Alguns estudos descrevem as bactérias Gram-positivas como a causa mais frequente de IRAS em pacientes com câncer, especialmente infecção de corrente sanguínea (Kosmidis & Chandrasekar 2012; Maschmeyer & Haas 2008; Wang et al., 2011; Wisplinghoff et al., 2003), no entanto, nos últimos anos tem sido observada uma mudança no perfil epidemiológico das infecções neste grupo, com a ascensão das infecções ocasionadas por Gram-negativas e

aumento da resistência antimicrobiana devido ao uso excessivo de antibióticos neste grupo de pacientes (Gudiol et al., 2013, Montassier et al., 2013; Bassetti & Righi 2013; Marín et al., 2014). Dentre as Gram-negativas, as Enterobacteriaceae *E. coli* e *Klebsiella* spp. são bactérias as mais frequentemente isoladas em pacientes com câncer seguido pelos bacilos não fermentadores de glicose *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. *Stenotrophomonas maltophilia* (Bassetti & Righi 2013; Marín et al., 2014; Wang et al., 2011). Neste grupo de bactérias, a produção de β -lactamases tem sido apontada como uma causa importante de multirresistência, devido a ampla variedade de enzimas existentes, incluindo as β -lactamases de espectro estendido (ESBL) como TEM, SHV e CTX-M, e as carbapenemases como GES, *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) e metalo- β -lactamases (MBL) como IMP, VIM e SPM (Bassetti & Righi 2013; Chaudhary & Payasi, 2014; Wang et al., 2011, Zafer et al., 2014).

Assim, estudo do perfil de resistência e frequência de isolados produtores de β -lactamases são importantes para a epidemiologia das IRAS, com a finalidade de recomendar e adotar as medidas de prevenção e controle mais adequadas. Logo, objetivo deste estudo foi investigar o perfil microbiológico e dados relacionados ao paciente e a infecção, e pesquisar os genes de resistência aos β -lactâmicos *bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M}, em isolados provenientes de pacientes oncológicos internados em um hospital situado em Recife, Pernambuco/Brasil.

Material e Métodos

Coleta e identificação dos isolados

Isolados de *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. e *Klebsiella* spp. foram coletados no período de novembro de 2012 a abril de 2014, provenientes de pacientes com neoplasia sólida, internados em um hospital especializado em assistência a pacientes com câncer situado em Recife, Pernambuco/Brasil.

As amostras analisadas foram coletadas por profissionais do hospital e enviadas para um laboratório terceirizado (Centro Integrado de Análises Clínicas - CIAC) para isolamento, identificação e realização do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos. A identificação da espécie foi realizada utilizando técnicas padrões de microbiologia (Winn et al., 2008) e os testes de susceptibilidade aos antimicrobianos foram realizados por meio de teste de disco difusão e seguiu os critérios instituídos pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (2014) (CLSI, 2014). Em seguida, os isolados foram fornecidos para a pesquisa e mantidos em estoque congelado com 20% de glicerol, a -20°C, para as análises posteriores.

Caracterização da amostra

Dados relativos ao tipo de amostra e setor de internamento no hospital foram coletados no laudo da cultura microbiana e o tipo de neoplasia sólida do prontuário médico.

Extração e quantificação de DNA

Foi extraído o DNA total dos isolados resistentes aos carbapenêmicos e/ou às cefalosporinas de terceira e quarta geração. Para tal, foi utilizando o kit de extração de DNA Brazol (LGC Biotecnologia) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante, e a quantificação do mesmo foi realizada por espectrofotometria (Ultraspec 3000, Pharmacia Biotech) em uma faixa de comprimento de onda entre 260 a 280nm.

PCR dos genes β -lactamases

Foram investigados genes β -lactamases (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}) nos isolados resistentes às cefalosporinas de terceira e quarta geração, e nos isolados resistentes aos carbapenêmicos, investigou-se os genes MBL (*bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}) e *bla*_{KPC}, utilizando primers específicos (Tabela 1) (Dong et al., 2008, Gales et al., 2003, Cabral et al., 2012, Saladin et al., 2002, Yigit et al., 2001). Estes genes foram pesquisados nos isolados de *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. e *Klebsiella* spp., com exceção do gene *bla*_{CTX-M}, cuja pesquisa foi realizada apenas nos isolados de *Klebsiella* spp..

Para cada gene, as reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 µL por tubo, compreendendo as concentrações descritas a seguir.

β-lactamases do grupo TEM, CTX-M e KPC

Para os genes *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M} foram utilizados 10ng de DNA genômico e para o gene *bla*_{KPC} foi utilizado 5ng do mesmo. Acrescentou-se, para os três genes, 25 pmol dos primers (Tabela 1), tampão 1x, 200µM do desoxirribonucleotídeo trifosfato (Ludwig Biotec), 1,5 mM de MgCl₂ e 2,0U da enzima Taq DNA polimerase (Promega) (Cabral et al.,2012, Saladin et al.,2002, Yigit et al.,2001).

Metalo-β-lactamases

Para os genes *bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} foram utilizados 25ng de DNA genômico, 10 pmol dos primers (Tabela 1), tampão 1x, 100µM do desoxirribonucleotídeo trifosfato (Ludwig Biotec), 1,5 mM de MgCl₂ e 1,0U da enzima Taq DNA polimerase (Promega) (Dong et al., 2008, Gales et al., 2003).

As amplificações por PCR foram realizadas em termociclador (Biosystems) da seguinte forma: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos (*bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}) ou 35 ciclos (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{KPC}) de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento segundo temperatura descrita na Tabela 1 por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, e depois uma extensão final de 10 minutos a 72°C) (Dong et al., 2008, Gales et al., 2003, Cabral et al.,2012, Saladin et al.,2002, Yigit et al.,2001).

Tabela 1. Primers utilizados na pesquisa de genes de β -lactamases.

Gene	Primer	Sequência (5'-3')	Temperatura anelamento	N. de ciclos	Referência
<i>bla</i> _{SPM-1}	SPM-1 F	CCTACAATCTAACGGCGACC	55,3°C	30	Gales et al., 2003
	SPM-1 R	TCGCCGTGTCCAGGTATAAC			
<i>bla</i> _{IMP-DIA}	IMP-DIA F	GGAATAGAGTGGCTTAATTCTC	50,6°C	30	Dong et al., 2008
	IMP-DIA R	GTGATGCGTCYCCAAYTTCACT			
<i>bla</i> _{VIM-DIA}	VIM-DIA F	CAGATTGCCGATGGTGTTTGG	56,8°C	30	Dong et al., 2008
	VIM-DIA R	AGGTGGGCCATTCAGCCAGA			
<i>bla</i> _{KPC}	KPC-1a	TGTCACTGTATCGCCGTC	63,0°C	35	Yigit et al.,2001
	KPC-1b	CTCAGTGCTCTACAGAAAACC			
<i>bla</i> _{TEM}	T1F	ATAAAATTCTTGAAGACGAAA	57,0°C	35	Cabral et al.,2012
	T2R	GACAGTTACCAATGCTTAATC			
<i>bla</i> _{CTX-MA}	CTX-M1	SCSATGTGCAGYACCAGTAA	61,0°C	35	Saladin et al.,2002
	CTX-M2	CCGCRATATGRTTGGTGGTG			

Os produtos de PCR foram marcados com o corante blue (Jena Bioscience) e submetidos à eletroforese a 1,0% em géis de agarose em TBE buffer (Tris-borato 0.089M e EDTA 0.002M) sob voltagem constante de 100V, visualizados sob luz UV e fotodocumentados.

Em cada partida de amplificação foi incluído um controle negativo, constituído de um tubo com todos os componentes da reação ao qual não foi adicionado DNA, e um controle positivo para cada gene: *bla*_{SPM-1} (*P. aeruginosa* PSA319), *bla*_{IMP} (*P. aeruginosa* 48–1997A) e *bla*_{VIM} (*P. aeruginosa* VIM-1) fornecido pelo Laboratório Alerta, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP); *bla*_{TEM} (*P. aeruginosa* P14HC), *bla*_{CTX-M} (*Enterobacter cloacae* Ec1A) e *bla*_{KPC} (*P. aeruginosa* P22A), pertencentes à coleção de cultura do Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular, Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Investigação dos perfis clonais

Os isolados MDR foram submetidos a tipagem molecular por meio da técnica Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-based PCR (ERIC-PCR), para identificação do perfil clonal dos isolados pesquisados. As reações de ERIC-PCR foram preparadas em um volume total de 25 µL por tubo, compreendendo: 100ng de DNA genômico, 10 pmol dos primers (ERIC-1 [5'- ATG TAAGCTCCTGGGGATTAC-3']; ERIC-2 [5'- AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3']) (Duan et al., 2009), Tampão 1x, 200µM do desoxirribonucleotídeo trifosfato (Ludwig Biotec), 1,5 mM de MgCl₂ e 1,0U da enzima Taq DNA polimerase (Promega). Os parâmetros de amplificação utilizado na ERIC-PCR foram: desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 92°C por 1 minuto, anelamento a 36°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 8 minutos, seguido de uma extensão final de 16 minutos à 72°C (Duan et al., 2009). Os produtos de PCR foram marcados com o corante green (Jena Bioscience) e submetidos à eletroforese a 1,5% em gel de agarose em TBE buffer (Tris-borato 0.089M e EDTA 0.002M) sob voltagem constante de 100V, visualizados sob luz UV e fotodocumentados para posterior análise de perfis clonais. Os padrões de bandas gerados na ERIC-PCR foram analisados de acordo com Tenover *et al.* (1995) e o dendrograma foi gerado utilizando o software past.exe.

Resultados

Caracterização da amostra

No período de novembro de 2012 a abril de 2014 foram coletados 169 isolados incluídos nos critérios da pesquisa, dos quais 75 *Klebsiella* spp. (44,4%), 58 *P. aeruginosa* (34,3%) e 36 *Acinetobacter* spp. (21,3%). Estes isolados foram provenientes de 107 pacientes com neoplasia sólida, internados em hospital especializado em assistência a pacientes com câncer situado em Recife, Pernambuco/Brasil. As amostras mais frequentes foram aspirado traqueal (37,9%), hemocultura (20,1%) e urocultura (12,4%); e mais da metade dos pacientes estavam internados em unidade de terapia intensiva (63,2%), sendo este um fator de risco para infecções provocadas por patógenos MDR (Tabela2).

Ao analisar as neoplasias agrupando todos os isolados clínicos do estudo, as mais frequentes foram tumor de intestino (11,4%), câncer de mama (10,5%) e câncer de próstata (8,7%), respectivamente. Entretanto, existe uma pequena variação na sequencia da o tipo de neoplasia sólida por ordem de magnitude entre as bactérias. Neste caso, para *P. aeruginosa* as neoplasias mais frequentes foram câncer de mama (13,3%), câncer de laringe (13,3%) e câncer de intestino (10,7%), para *Acinetobacter* spp. foram câncer de próstata (19,0%), câncer de intestino (14,3%) e câncer de pulmão (7,1%) e para *Klebsiella* spp. foram câncer de intestino (10,8%), câncer de próstata (9,8%) e câncer de estômago (6,9%) (Tabela 2).

Tabela 2. Caracterização dos isolados clínicos quanto ao tipo de amostra e local de internamento durante o isolamento do patógeno e tipo de neoplasia sólida do paciente.

	<i>P. aeruginosa</i> (N=58)		<i>Acinetobacter</i> spp. (N=36)		<i>Klebsiella</i> spp. (N=75)		Total (N=169)	
Tipo de amostra	n	F	N	F	n	F	n	F
Aspirado Traqueal	24	41,4%	14	38,9%	26	34,7%	64	37,9%
Sangue	13	22,4%	6	16,7%	15	20,0%	34	20,1%
Urina	6	10,3%	3	8,3%	12	16,0%	21	12,4%
Ponta de Cateter Venoso Central	5	8,6%	2	5,6%	3	4,0%	10	5,9%
Líquido Peritoneal	1	1,7%	1	2,8%	3	4,0%	5	3,0%
Outros	9	15,5%	10	27,8%	16	21,3%	35	20,7%
Local de internamento								
UTI	41	70,7%	24	66,7%	43	57,3%	108	63,9%
Unidade de Oncologia Médica	6	10,3%	6	16,7%	15	20,0%	27	16,0%
Unidade de Oncologia Cirúrgica	9	15,5%	4	11,1%	14	18,7%	27	16,0%
Unidade de Cuidados Paliativos	1	1,7%	2	5,6%	3	4,0%	6	3,6%
Unidade de Oncologia Pediátrica	1	1,7%	0	0,0%	0	0,0%	1	0,6%
Tipo de neoplasia sólida								
Câncer de intestino, cólon e reto	8	10,7%	6	14,3%	11	10,8%	25	11,4%
Câncer de mama	10	13,3%	7	16,7%	6	5,9%	23	10,5%
Câncer de próstata	1	1,3%	8	19,0%	10	9,8%	19	8,7%
Câncer de laringe	10	13,3%	2	4,8%	2	2,0%	14	6,4%
Câncer cerebral	6	8,0%	2	4,8%	4	3,9%	12	5,5%
Câncer de colo de útero	3	4,0%	2	4,8%	4	3,9%	9	4,1%
Câncer de estômago	2	2,7%	0	0,0%	7	6,9%	9	4,1%
Câncer de pulmão	1	1,3%	3	7,1%	4	3,9%	8	3,7%
Outros	17	22,7%	6	14,3%	27	26,5%	50	22,8%

Nota: alguns pacientes tiveram infecções provocadas por mais de um isolado bacteriano, neste caso, os dados relativos ao local de internamento e tipo de neoplasia sólida estão influenciados por esta repetição.

Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

O perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos revelou que o *Acinetobacter* spp. apresentou os maiores percentuais de resistência, enquanto que *Klebsiella* spp. apresentou os maiores percentuais de sensibilidade aos antimicrobianos. Foi possível observar também um elevado percentual de resistência aos carbapenêmicos tanto em *P. aeruginosa* (53,4%) como em *Acinetobacter* spp. (66,7%). Entretanto, em *Klebsiella* spp., os carbapenêmicos foram a

classe de antimicrobianos com maior percentual de sensibilidade, demonstrando ser ainda uma boa opção terapêutica para este grupo de bactéria (Tabela 3).

De uma forma geral, os aminoglicosídeos foram a classe de antimicrobianos cujas bactérias apresentaram maior percentual de sensibilidade, variando de 55,2% em *P. aeruginosa* e 84,4% em *Klebsiella* spp., ambos frente a amicacina (Tabela 3).

Ao analisarmos os maiores percentuais de resistência por bactéria, verificamos que em *P. aeruginosa* 53,4% das cepas foram resistentes ao imipenem e ao meropenem. Já para os isolados de *Acinetobacter* spp. o perfil de maior resistência foi detectado para os antimicrobianos ciprofloxacina (77,8%), ceftriaxona (75,0%) e ceftazidima (72,2%); e nos isolados de *Klebsiella* spp. ampicilina (88,3%) e ceftriaxona (51,9%) (Tabela 3).

Em relação ao percentual MDR, verificamos este perfil em 58,6% das *P. aeruginosa*, 77,8% dos *Acinetobacter* spp. e 64,0% das *Klebsiella* spp.

Tabela 3. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos nos isolados de *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. e *Klebsiella* spp.

Antimicrobiano	<i>P. aeruginosa</i> (N=58)			<i>Acinetobacter</i> spp. (N=36)			<i>Klebsiella</i> spp. (N=75)		
	S	R	NT	S	R	NT	S	R	NT
Ampicilina	-	-	-	-	-	-	9,1%	88,3%	2,6%
Amoxicilina-ácido clavulânico	-	-	-	-	-	-	36,4%	48,1%	15,6%
Piperacilina-tazobactam	51,7%	31,0%	17,2%	-	-	-	66,2%	27,3%	6,5%
Ampicilina-sulbactam	-	-	-	77,8%	16,7%	5,6%	-	-	-
Aztreonam	56,9%	36,2%	6,9%	-	-	-	48,1%	49,4%	2,6%
Ceftriaxona	-	-	-	22,2%	75,0%	2,8%	37,7%	51,9%	10,4%
Ceftazidima	53,4%	36,2%	10,3%	16,7%	72,2%	11,1%	-	-	-
Cefepime	41,4%	37,9%	20,7%	22,2%	69,4%	8,3%	-	-	-
Imipenem	44,8%	53,4%	1,7%	33,3%	66,7%	0,0%	87,0%	11,7%	1,3%
Meropenem	46,6%	53,4%	0,0%	33,3%	66,7%	0,0%	85,7%	10,4%	3,9%
Amicacina	55,2%	44,8%	0,0%	63,9%	33,3%	2,8%	84,4%	14,3%	1,3%
Gentamicina	70,7%	24,1%	5,2%	63,9%	36,1%	0,0%	74,0%	24,7%	1,3%
Ciprofloxacina	44,8%	43,1%	12,1%	22,2%	77,8%	0,0%	55,8%	40,3%	3,9%
Sulfametoxazol-trimetoprim	-	-	-	58,3%	38,9%	2,8%	62,3%	35,1%	2,6%
Tetraciclina	-	-	-	91,7%	8,3%	0,0%	-	-	-

Nota: S: sensível; R: resistente; NT: não testado; -: antibiótico não testado nas bactérias de determinado gênero.

PCR dos genes β -lactamases

Os isolados para pesquisa dos genes β -lactamases foram selecionados a partir dos critérios descritos na metodologia e os resultados alcançados estão dispostos na tabela 4.

Os genes *bla*_{SPM-1} e *bla*_{KPC} foram detectados em 11 isolados (35,5%) e oito isolados (25,8%) de *P. aeruginosa*, respectivamente. Destes, um isolado apresentou concomitantemente os genes *bla*_{SPM-1} e *bla*_{KPC}. Nenhum isolado foi positivo para os genes *bla*_{IMP-1} e *bla*_{VIM} (Tabela 4).

Quanto a outros genes β -lactamase, *bla*_{TEM} foi identificado em sete isolados de *Acinetobacter* spp. (25,9%) e 11 isolados de *Klebsiella* spp. (30,6%), porém não foi

amplificado nos isolados de *P. aeruginosa* do hospital. Enquanto que o gene *bla*_{CTX-M} apresentou a maior frequência molecular do estudo, positivando em 21 isolados de *Klebsiella* spp., o que representou 58,3% das bactérias analisadas para este gene (Tabela 4). Observou-se ainda que dos 11 isolados de *Klebsiella* spp. *bla*_{TEM} positivos, oito dele também apresentaram o gene *bla*_{CTX-M}.

Tabela 4. Distribuição dos genes β -lactamase por patógenos bacterianos.

Gene	<i>P. aeruginosa</i>		<i>Acinetobacter</i> spp.		<i>Klebsiella</i> spp.		Total	
	%	n/N	%	n/N	%	n/N	%	n/N
<i>bla</i> _{SPM-1}	35,5%	(11/31)	0,0%	(0/26)	0,0%	(0/15)	15,3%	(11/72)
<i>bla</i> _{IMP}	0,0%	(0/31)	0,0%	(0/26)	0,0%	(0/15)	0,0%	(0/72)
<i>bla</i> _{VIM}	0,0%	(0/31)	0,0%	(0/26)	0,0%	(0/15)	0,0%	(0/72)
<i>bla</i> _{KPC}	25,8%	(8/31)	0,0%	(0/23)	0,0%	(0/7)	13,1%	(8/61)
<i>bla</i> _{TEM}	0,0%	(0/22)	25,9%	(7/27)	30,6%	(11/36)	21,2%	(18/85)
<i>bla</i> _{CTX-M}	NT	(-/-)	NT	(-/-)	58,3%	(21/36)	58,3%	(21/36)

Nota: alguns isolados contem mais de um gene de β -lactamase.

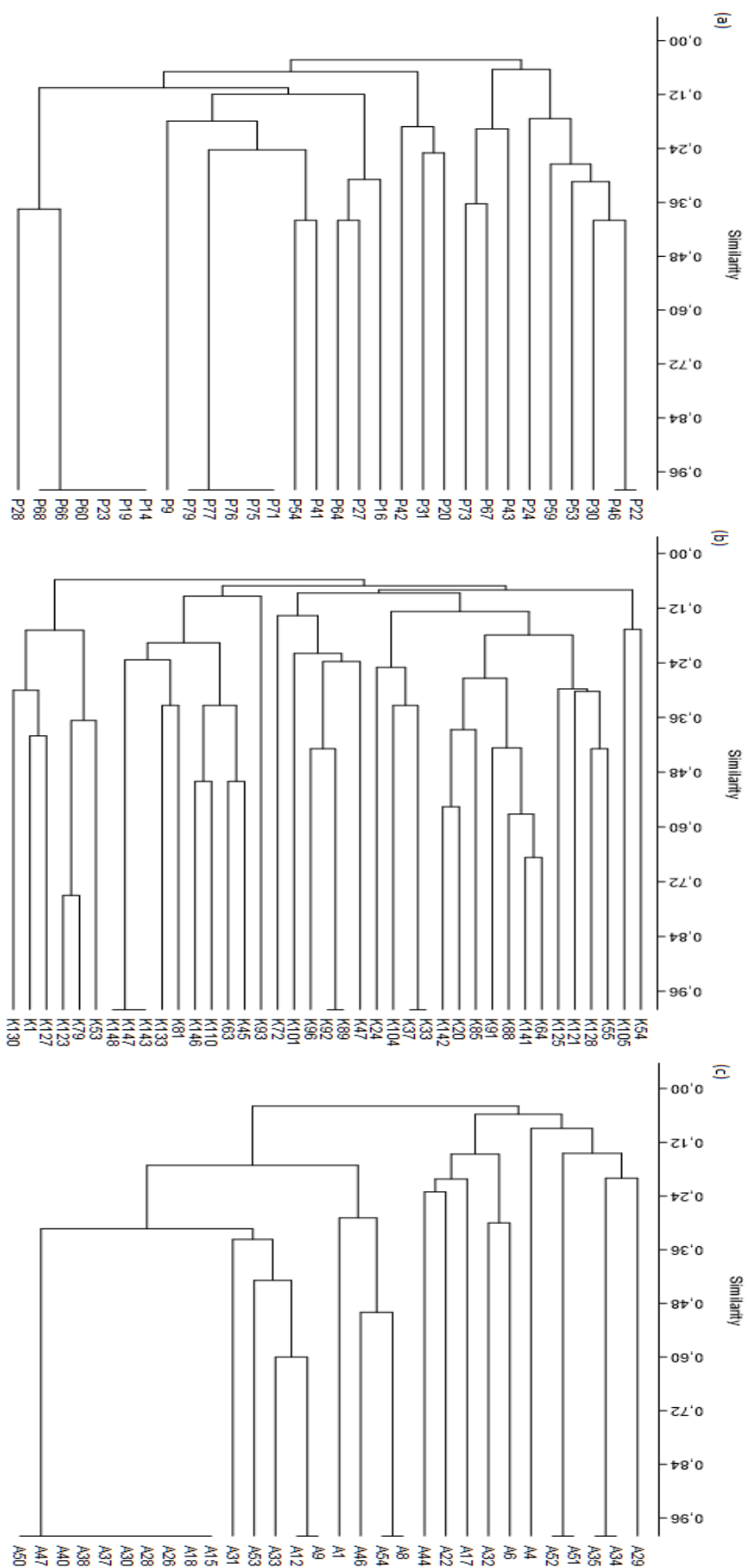
Investigação dos perfis clonais

A investigação dos perfis clonais foi realizada apenas nos isolados MDR, totalizando 30 *P. aeruginosa*, 30 *Acinetobacter* spp. e 39 *Klebsiella* spp.. Foram identificados 20 perfis diferentes dentre as *P. aeruginosa*, sedo três destes considerados perfis clonais, cuja similaridade é de 100%. Os outros perfis tiveram similaridade variando de 4% a 40% (Figura 1).

Dentre os 30 *Acinetobacter* spp., foram identificados 17 perfis diferentes, dos quais cinco eram formados por clones, havendo um clone predominante, cujo perfil foi identificado em 10 isolados. Os demais perfis tiveram similaridade variando de 4% a 60% (Figura 1).

Já entre as 39 *Klebsiella* spp., houve a detecção de 35 perfis diferentes, sendo três perfis clonais e a similaridade dos demais variou de 5% a 75%.

Figura1. Dendrograma obtido com base na análise da ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-Polymerase Chain Reaction) dos isolados multirresistentes. (a) *P. aeruginosa*; (b) *Klebsiella* spp.; (c) *Acinetobacter* spp..



Discussão

Diversos mecanismos de resistência natural ou adquirida aos antimicrobianos podem estar relacionados ao insucesso do tratamento de infecções. Frente aos β -lactâmicos, o mecanismo mais importante é a síntese de enzimas β -lactamases, as quais exibem uma grande diversidade de enzimas, com mais de 1600 variantes (Jacoby & Bush, Lahey, 2015).

Neste estudo, 169 isolados clínicos de *Acinetobacter* spp., *P. aeruginosa* e *Klebsiella* spp. foram obtidos a partir de várias amostras provenientes de pacientes com neoplasia sólida, que foram submetidos a pesquisa de genes responsáveis pela síntese das enzimas SPM-1, IMP, VIM, KPC, TEM e CTX-M. A bactéria mais frequente no estudo foi a *Klebsiella* spp. seguido pela *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp..

Em um estudo semelhante, porém realizado em pacientes não oncológicos, Chaudhary & Payasi (2014), investigaram genes das β -lactamases AmpC, OXA, KPC, BlaZ e ESBL em *E. coli*, *Klebsiella* spp., *A. baumannii*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* coletadas de pacientes internados em diferentes hospitais da Índia. Neste estudo, a frequência de *P. aeruginosa* foi quase três vezes superior a de *Klebsiella* spp., enquanto que em nosso estudo ocorreu o inverso, sendo a proporção de *P. aeruginosa* foi cerca de 30% inferior a de *Klebsiella* spp.. Em ambos estudos, a proporção de *Acinetobacter* spp. foi a menor, dentre as três bactérias.

Ram et al. (2012) analisaram os índices de infecção bacteriana e susceptibilidades aos antibióticos entre os episódios iniciais e subsequentes de infecção em pacientes com câncer hematológico e obtiveram a mesma ordem de frequência das bactérias do nosso estudo, no entanto, a diferença entre *Klebsiella* spp. e *P. aeruginosa* foi de apenas 5%. Desta forma, observa-se uma pequena variação na ordem da incidência dos patógenos analisados em nosso estudo, no entanto, em todos os casos, *P. aeruginosa*, *Klebsiella* spp. e *Acinetobacter* spp., figuram entre as cinco principais causas de infecção em pacientes oncológicos e não

oncológicos (Pongas et. al., 2012, Ram et al., 2012, Chaudhary & Payasi 2014, Andria et al., 2015).

Quanto se trata do tipo de amostra clínica, aspirado traqueal foi o mais frequente em nosso estudo, seguido por sangue e urina. No estudo de Chaudhary & Payasi (2014), as amostras sanguíneas também foram o segundo tipo de material clínico mais frequente, no entanto, escarro foi o primeiro tipo de amostra para *A. baumannii* e *Klebsiella* spp. e pus para *P. aeruginosa*. Muitos estudos focam na pesquisa de infecção da corrente sanguínea por estar associado a altas taxas de morbidade e mortalidade, seja diretamente ou por interferir no cronograma da quimioterapia, o que torna a hemocultura um exame de importante valor preditivo de infecção (Araujo, 2012, Miedema et al., 2013, Moghnieh et al., 2015, Paul et al., 2010).

Em relação ao tipo de câncer, os resultados encontrados no presente estudo corroboram com os dados do Sistema de Informação Hospitalar do Sistema Único de Saúde (SIH-SUS) no mesmo período e local, cuja análise da estatística de internamento por câncer no estado de Pernambuco (população alvo) revelou que os tipos de cânceres mais frequentes dentre os pacientes incluídos no nosso estudo, correspondem à magnitude das mesmas como causa de internamento no local e período do estudo (Brasil, 2015).

Em relação aos dados microbiológicos, o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das amostras de nosso estudo demonstrou um percentual de resistência aos carbapenêmicos superior a 50% tanto em *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp., e próximo a 10% em *Klebsiella* spp..

Na população de uma forma geral, estudos recentes apontam crescimento que a prevalência de agentes patogênicos Gram-negativos resistentes ao carbapenêmicos tem aumentado drasticamente na última década, especialmente entre *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Enterobacteriaceae* (Akova et al., 2012; Lee & Doi, 2014).

Em relação ao percentual MDR, verificamos que 58,6% das *P. aeruginosa*, 77,8% dos *Acinetobacter* spp. e 64,0% das *Klebsiella* spp. demonstraram este perfil. Percentuais bastante inferiores foram detectados no estudo de Maríns *et al.* (2014), também realizado em pacientes com tumor sólido internado em um hospital espanhol entre janeiro de 2006 e julho de 2012. Neste estudo, a frequência de bacilos Gram-negativos MDR foi de 13,4% (43/320), dos quais cinco eram *P. aeruginosa* (9,6%), uma era *A. baumannii* (50,0%), 20 eram *Enterobacteriaceae* produtoras de β -lactamase de espectro estendido (7,6%), 13 eram *Enterobacteriaceae* produtoras de AmpC (5,0%) e uma era *Klebsiella oxytoca* hiperprodutora de β -lactamase cromossomal (11,1%).

Ao compararmos a frequência de isolados MDR do nosso estudo com outros realizados com pacientes não oncológicos internados em hospitais localizados na mesma cidade do presente estudo, verificamos percentuais de isolados MDR semelhantes aos nossos, como no estudo de Jácome *et al.* (2012a), que verificou um percentual de *P. aeruginosa* MDR de 54,1%; Hinrichsen *et al.* (2014), que detectou percentuais de *Acinetobacter* spp. MDR variando de 53,0% a 86,0% em dois hospitais distintos; e Melo *et al.* (2011), que encontrou um percentual global isolados de *Klebsiella* spp. MDR de 60,6% dentre os isolados investigados. Desta forma, é possível perceber que a elevada frequência de isolados MDR em hospitais de Recife tem sido constante nos últimos anos.

Dentre os isolados resistentes aos carbapenêmicos ou a ceftazidima, nosso estudo identificou que 35,5% das *P. aeruginosa* exibiram o gene *bla*_{SPM-1}. Considerando hospitais situados na mesma região, Jácome *et al.* (2012a) detectaram um frequência inferior, equivalente a 20,7% do total de isolados resistentes aos carbapenêmicos ou a ceftazidima e 46,2% quando considerou apenas os isolados positivos no teste fenotípico para MBL. Já Cavalcanti *et al.* (2012), em outro hospital universitário situado na mesma cidade do nosso

estudo, identificaram um percentual mais elevado, com a detecção do gene *bla*_{SPM-1} em 83,6% dos isolados resistentes a imipenem ou ceftazidima investigados.

Em contrapartida, em pacientes com câncer, estudos realizados em um hospital pediátrico localizado em São Paulo, Brasil, houve uma detecção do gene *bla*_{SPM-1} que variou de 33,3% a 56,3% (Fernandes et al., 2010, Quiles et al., 2015). Estes resultados mostram a persistência de *P. aeruginosa* SPM-1 positiva nos hospitais brasileiros, em geral, ao longo dos anos.

Embora as MBL não sejam as carbapenemase predominantes em *Acinetobacter* spp., estas enzimas contribuem para o alto nível de resistência aos carbapenêmicos (Lin & Lan, 2014). A maior concentração dos casos de MBL em espécies de *Acinetobacter* ocorre em países Asiáticos, seguidos pelos Europeus, e os genes mais frequentemente identificados neste gênero foram *bla*_{IMP-1}, *bla*_{VIM-2} e *bla*_{NDM-1}, respectivamente (Lin & Lan, 2014).

Os genes *bla*_{IMP} e *bla*_{VIM} raramente são detectados em hospitais brasileiros, havendo diversos estudos nos quais estes genes não foram amplificação, seja em pacientes oncológicos ou não oncológicos (Fernandes et al., 2010, Jácome et al., 2012a, Cavalcanti et al., 2012, Quiles et al., 2015). No entanto, estes genes merecem atenção uma vez que já foram encontrados em alguns estados brasileiros, especialmente o *bla*_{IMP} que já foi detectado em São Paulo (Sader et al., 2005), Rio de Janeiro (Pellegrino et al., 2001), Brasília (Mendes et al., 2004), João Pessoa (Santos-Filho et al., 2002), Porto Alegre (Martins et al., 2007) e Florianópolis (Scheffer et al., 2010). Enquanto que o gene *bla*_{VIM} já foi detectado em São Paulo (Sader et al., 2005; Franco et al., 2010).

No presente estudo, o gene *bla*_{KPC} foi amplificado apenas em *P. aeruginosa* (25,8%), no entanto, vale destacar que o número de isolados de *Klebsiella* spp. resistentes aos carbapenêmicos foi muito baixo, reforçando a ausência dos genes carbapenemase dentre as *Klebsiella* spp. no hospital estudado. Outros estudos realizados em hospitais de Recife, com pacientes não oncológicos, apresentaram uma maior frequência de isolados de *K. pneumoniae*

resistentes aos carbapenêmicos, assim como isolados portadores do gene *bla*_{KPC} (Cabral et al., 2012; Melo et al., 2014).

Apesar do gene *bla*_{KPC} raramente ser detectado em *P. aeruginosa* (Zafer et al., 2014), é importante salientar que o primeiro caso de identificação do gene *bla*_{KPC} em *P. aeruginosa* no Brasil, ocorreu em um hospital público situado em Recife (Jácome et al., 2012b), mesma cidade do nosso estudo. Por outro lado, seguindo uma tendência mundial, Chaudhary & Payasi (2014) obteve um resultado oposto ao do nosso estudo, em pacientes não oncológicos da Índia, onde não foi amplificado o gene *bla*_{KPC} em *P. aeruginosa* e *A. baumannii*, no entanto, este gene foi amplificado em 26,1% dos isolados de *K. pneumoniae* e 17,4% de *K. oxytoca* (Chaudhary & Payasi, 2014). Já Quiles et al. (2015), em pacientes oncológicos, não detectou o gene *bla*_{KPC} em *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. e *Klebsiella* spp., em uma amostra de infecção de corrente sanguínea oriunda de pacientes pediátricos (Quiles et al., 2015).

Quanto a outras β -lactamases, o gene *bla*_{TEM} foi identificado em 25,9% dos isolados de *Acinetobacter* spp., 30,6% dos isolados de *Klebsiella* spp.. Percentuais inferiores foram detectados em pacientes não oncológicos internados em hospitais da Índia, nos quais o gene *bla*_{TEM} foi detectado em *A. baumannii* (9,6% *bla*_{TEM-1}, 9,6% *bla*_{TEM-3}, 11,5% *bla*_{TEM-50}), *K. pneumoniae* (21,7% *bla*_{TEM-1}, 21,7% *bla*_{TEM-3}), *K. oxytoca* (21,7% *bla*_{TEM-1}) (Chaudhary & Payasi 2014). E diferente do presente estudo onde o gene *bla*_{TEM} não foi detectado em *P. aeruginosa*, Chaudhary & Payasi (2014) detectaram os genes *bla*_{TEM-1}, *bla*_{TEM-3} e *bla*_{TEM-50} em 14,5%; 14,0% e 6,0% das bactérias dessa espécie, respectivamente. Também na Índia, porém em pacientes não oncológicos, Chandra e Goswami (2012) detectaram um incidência de ESBL em 65,7% dos isolados de *K. pneumoniae* investigados, e destes 80% foi positivo para ambos os genes *bla*_{TEM}.

De acordo com um estudo de revisão que teve por objetivo verificar a epidemiologia nosocomial das Enterobacteriaceae produtoras de ESBL na América Latina, cerca de 58% dos isolados de *K. pneumoniae* são ESBL positivas no Brasil, e CTX-M é a mais prevalente. (Gusmán-Blanco et al., 2014).

No presente estudo, a frequência do gene *bla*_{CTX-M} em isolados de *Klebsiella* spp. foi de 58,3%, sendo este o gene mais frequente em nosso estudo, corroborando com outros achados na América Latina, descritos na literatura (Morfín-Otero et al., 2013, Gusmán-Blanco et al., 2014, Nogueira et al., 2015).

Também merece atenção à identificação de clones multirresistentes e portadores de genes β -lactamase em diferentes setores do hospital, apontando para o risco de disseminação destes patógenos no hospital. A aplicação de técnicas de tipagem molecular em hospitais permite o mapeamento da dinâmica de transmissão das infecções, levando assim a aplicação de medidas de controle de infecção mais direcionadas ao cenário local (Hafiane; Ravaoarinoro, 2008).

Adicionalmente, a aplicação de medidas efetivas de controle de infecção em conjunto vigilância microbiológica e seu padrão de resistência são de extrema importância para reduzir a taxa de morbidade e mortalidade devido a infecções bacterianas, além de reduzir custos hospitalares (Vasudevan et. al., 2015). Para tanto, em 2014, foi instituído por lei na Alemanha a emissão de relatórios de vigilância sobre os agentes infecciosos e seus padrões de resistência a antibióticos, bem como sobre o uso de antibióticos em muitas instituições médicas (Warnke et al., 2014).

Assim, estudos de vigilância para conhecer o perfil microbiológico e o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, associados à identificação molecular de mecanismos genéticos de resistência, são úteis para determinar a diversidade dos microrganismos e dos genes de resistência presentes no ambiente hospitalar, além de orientar a terapêutica apropriada, e colaborar para a implantação de medidas de controle de infecção,

principalmente de pacientes mais susceptíveis as IRAS. Adicionalmente, em pacientes com câncer, conhecer os sítios de resgate dos isolados e suas respectivas neoplasias relacionadas podem contribuir para o direcionamento de estratégias e de normas de cuidados específicas por grupo de risco, que visem minimizar os episódios de IRAS nesses pacientes.

Referências

1. **Akova, M., Daikos, G.L., Tzouveleki, L. & Carmeli, Y. (2012).** Interventional strategies and current clinical experience with carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology and Infection* **18**:439-48.
2. **Andria, N., Henig, O., Kotler, O., Domchenko, A., Oren, I., Zuckerman, T., Ofran, Y., Fraser, D. & Paul, M. (2015).** Mortality burden related to infection with carbapenem-resistant Gram-negative bacteria among haematological cancer patients: a retrospective cohort study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **70**:3146-3153.
3. **Araujo, M.R.E. (2012).** Hemoculturas: recomendações de coleta, processamento e interpretação dos resultados. *Journal of Infection Control* **1**:08-19.
4. **Bassetti, M. & Righi, E. (2013).** Multidrug-resistant bacteria: what is the threat? Hematology. *American Society of Hematology Education Program* **2013**:428-432.
5. **Brasil (2015).** Internações segundo Lista Morbidade CID-10. Capítulo CID-10: II. Neoplasias (tumores). Período: Novembro/2012-Abril/2014. Ministério da Saúde - Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS) [Accessed Jul 2015]. Available from: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/nipe.def>.
6. **Cabral, A.B; Melo, R.C.A., Maciel, M.A.V. & Lopes, A.C.S. (2012).** Multidrug resistance genes, including blaKPC and blaCTX-M-2, among *Klebsiella pneumoniae*

isolated in Recife., Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **45**:572-578.

7. **Cavalcanti, F.L.S., Almeida, A.C.S., Vilela, M.A., Morais, M.M.C. & Morais-Junior, M.A. (2012).** Changing the epidemiology of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian teaching hospital: the replacement of São Paulo metallo- β -lactamase-producing isolates. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **107**: 420-423.
8. **CDC. Centers for Disease Control and Prevention (2013).** Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia. [Accessed Fev 2016]. Available from: www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf
9. **Chandra,V. & Goswami, P.N. (2014).** Detection of TEM. & SHV genes in Extended Spectrum Beta Lactamase (ESBL) producing *E.coli.* & *Klebsiella pneumoniae* isolated from a Tertiary Care Cancer Hospital. *National Journal of Medical Research* **4**:201:204.
10. **Chaudhary, M. & Payasi, A. (2014).** Molecular characterization and in vitro susceptibilities of β -lactamase producing *Escherichia coli.*, *Klebsiella* species., *Acinetobacter baumannii.*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* to CSE1034 and other β -lactams. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* **7S1**:S217-23.
11. **CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2014).** Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility. Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. CLSI document M100-S24. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, Wayne., PA., pp50-63.
12. **Dong, F., Xu, X.W., Song, W.Q., Lü, P., Yu, S.J., Yang, Y.H. & Shen, X.Z. (2008).** Characterization of multidrug-resistant and metallo-betalactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a paediatric clinic in China. *Chinese Medical Journal* **121**:1611-1616.

13. **Duan, H., Chai, T., Liu, J., Zhang, X., Qi, C., Gao, J., Wang, Y., Cai, Y., Miao, Z., Yao, M. & Schlenker, G. (2009).** Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. *Environmental research* **109**:511–517.
14. **Fernandes, T.A., Pereira, C.A.P., Petrili, A.S. & Pignatari, A.C.C. (2010).** Molecular characterization of carbapenem-resistant and metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from blood cultures from children and teenagers with cancer. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **43**:372-376.
15. **Franco, M.R.G., Caiaffa-Filho, H.H., Burattini, M.N. & Rossi, F. (2010).** Metallo-beta-lactamases among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian university hospital. *Clinics (São Paulo, Brazil)* **65**:825-829.
16. **Fukuta, Y., Muder, R.R., Agha, M.E., Clarke, L.G., Wagener, M.M., Hensler, A.M. & Doi, Y. (2013).** Risk factors for acquisition of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* among cancer patients. *American Journal of Infection Control* **41**: 1249–1252.
17. **Gales, A.C., Menezes, L.C., Silbert, S. & Sader, H.S. (2003).** Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenêmicos-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **52**:699-702.
18. **Ghamgosha, M., Zahedani, S.S., Kafilzadeh, F., Bameri, Z. (2014).** Metallo- β -lactamase genes VIM-1., SPM-1 and IMP-1 in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Zahedan Hospitals. *International Journal of Infection*. **1**:e19635.
19. **González, L.J., Moreno, D.M., Bonomo, R.A. & Vila1, A.J. (2014).** Host-specific enzyme-substrate interactions in SPM-1 metallo- β -Lactamase are modulated by second sphere residues. *PLoS pathogens* **10**:e1003817.

20. **Gudiol, C., Calatayud, L., Garcia-Vidal, C., Lora-Tamayo, J., Cisnal, M., Duarte, R., Arnan, M., Marin, M., Carratalà, J. & Gudiol, F. (2010).** Bacteraemia due to extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* (ESBL-EC) in cancer patients: clinical features., risk factors., molecular epidemiology and outcome. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **65**:333-41.
21. **Guzmán-Blanco, M., Labarca, J.A., Villegas, M.V, Gotuzzo, E. & Latin America Working Group on Bacterial Resistance, (2014).** Extended spectrum β -lactamase producers among nosocomial *Enterobacteriaceae* in Latin America. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* **18**:421–433.
22. **Hafiane, A. & Ravaoarinoro, M. (2008).** Différentes méthodes de typage des souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées des patients atteints de mucoviscidose. *Médecine et Maladies Infectieuses* **38**:238–247.
23. **Hinrichsen, S.L., Falcão, E., Vilella, T.A.S., Lira, C., Santos-Junior, B.J. & Cruz, P.W.S. (2014).** Occurrence of *Acinetobacter* in two private tertiary hospitals in Northeastern Brazil. *Revista Panamericana de Infectología* **16**:174-179.
24. **Jacoby, G. & Bush, K. (2015).** β -Lactamase classification and amino acid sequences for TEM., SHV and OXA extended-spectrum and inhibitor resistant enzymes. Burlington: *Lahey Clinic*. [Accessed Jul 2015]. Available from: www.lahey.org/studies/
25. **Jácome, P.R.L.A., Alves, L.R., Cabral, A.B., Lopes, A.C.S. & Maciel, M.A.V. (2012a).** Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance and virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Recife., State of Pernambuco., Brazil. *Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **45**:707-712.
26. **Jácome, P.R.L.A., Alves, L.R., Cabral, A.B., Lopes, A.C.S. & Maciel, M.A.V. (2012b).** First Report of KPC-Producing *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **56**:4990.

27. **Kosmidis, C.I. & Chandrasekar, P.H. (2012).** Management of gram-positive bacterial infections in patients with cancer. *Leukemia. & Lymphoma* **53**:8-18.
28. **Lee, C.S. & Doi, Y. (2014).** Therapy of Infections due to Carbapenem-Resistant Gram-Negative Pathogens. *Infection. & Chemotherapy* **46**:149-164.
29. **Lee, J.Y., Limb, M.H., Heoc, S.T. & Koa, K.S. (2012).** Repeated isolation of *Pseudomonas aeruginosa* isolates resistant to both polymyxins and carbapenems from 1 patient. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **72**:267–271.
30. **Lin, M.F. & Lan, C.Y. (2014).** Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: From bench to bedside. *World Journal of Clinical Cases* **2**:787-814.
31. **Magill S.S., Edwards J.R., Stat M., Bamberg W. Beldavs Z.G., Dumyati G., Kainer M.A., Lynfield R., Maloney M., McAllister-Hollod L., Nadle J., Ray S.M., Thompson D.L., Wilson L.E., Fridkin, S.K. (2014).** Multistate Point-Prevalence Survey of Health Care–Associated Infections. *The New England Journal of Medicine* **370**;13 nejm.org march 27: 1198-1208.
32. **Marín, M., Gudiol, C., Garcia-Vidal, C., Ardanuy, C. & Carratalà, J. (2014).** Bloodstream infections in patients with solid tumors: epidemiology., antibiotic therapy., and outcomes in 528 episodes in a single cancer center. *Medicine* **93**:143-9.
33. **Martins, A.F., Zavascki, A.P., Gaspareto, P.B. & Barth, A.L. (2007).** Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* Producing SPM-1-like and IMP-1-like Metallo- β -lactamases in Hospitals from Southern Brazil. *Infection* **35**:457-460.
34. **Maschmeyer, G. & Haas, A. (2008).** The epidemiology and treatment of infections in cancer patients. *International Journal of Antimicrobial Agents* **31**:193–197.
35. **Melo, M.E.S., Cabral, A.B., Maciel, M.A.V., da Silveira, V.M. & Lopes, A.C.S. (2011).** Phylogenetic groups among *Klebsiella pneumoniae* isolates from Brazil: relationship with antimicrobial resistance and origin. *Current Microbiology* **62**:1596-601.

36. **Melo, R.C.A., De Barros, E.M.R., Loureiro, N.G., De Melo, H.R.L, Maciel, M.A.V. & Lopes, A.C.S. (2014).** Presence of fimH., mrkD., and irp2 Virulence Genes in KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Recife-PE., Brazil. *Current Microbiology* **69**:10.1007/s00284--831.
37. **Mendes, R.E., Toleman, M.A., Ribeiro, J., Sader, H.S., Ronald, N., Jones, R.N. & Walsh, T.R. (2004).** Integron Carrying a Novel Metallo- β -Lactamase Gene., blaIMP-16., and a Fused Form of Aminoglycoside-Resistant Gene aac(6')-30/aac(6')-Ib': Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**:4693–4702.
38. **Miedema, K.G., Winter, R.H., Ammann, R.A., Droz, S., Spanjaard, L., de Bont, E.S., Kamps, W.A., van de Wetering, M.D. & Tissing, W.J. (2013).** Bacteria causing bacteremia in pediatric cancer patients presenting with febrile neutropenia--species distribution and susceptibility patterns. *Supportive Care in Cancer* **21**:2417-2426.
39. **Moghnieh, R., Estaitieh, N., Mugharbil, A., Jisr, T., Abdallah, D.I., Ziade, F., Sinno L. & Ibrahim, A. (2015).** Third generation cephalosporin resistant *Enterobacteriaceae* and multidrug resistant gram-negative bacteria causing bacteremia in febrile neutropenia adult cancer patients in Lebanon., broad spectrum antibiotics use as a major risk factor., and correlation with poor prognosis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **12**:5-11.
40. **Montassier, E., Batard, E., Gastinne, T., Potel, G. & de La Cochetière, M.F. (2013).** Recent changes in bacteremia in patients with cancer: a systematic review of epidemiology and antibiotic resistance. *European Journal of Clinical Microbiology. & Infectious Diseases* **32**:841-850.
41. **Morfín-Otero, R., Mendoza-Olazarán, S., Silva-Sánchez, J., Rodríguez-Noriega, E., Laca-Díaz, J., Tinoco-Carrillo, P., Petersen, L., López, P., Reyna-Flores, F.,**

- Alcantar-Curiel, D., Garza-Ramos, U. & Garza-González, E. (2013).** Characterization of *Enterobacteriaceae* isolates obtained from a tertiary care hospital in Mexico., which produces extended-spectrum β -lactamase. *Microbial Drug Resistance* **19**:378-83.
42. **Nogueira, K.S., Conte, D., Maia, F.V. & Dalla-Costa, L.M. (2015).** Distribution of extended-spectrum β -lactamase types in a Brazilian tertiary hospital. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **48**:162-169.
43. **Paul, M., Shani, V., Muchtar, E., Kariv, G., Robenshtok, E. & Leibovici, L. (2010).** Systematic review and meta-analysis of the efficacy of appropriate empiric antibiotic therapy for sepsis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **54**:4851–4863.
44. **Pellegrino, F.L.P., Moreira, M.B., Nouer, S.A. (2001).** Antimicrobial resistance and genotype characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a university affiliated hospital in Rio de Janeiro., Abstract L-14. In: 101th ASM General Meeting., 2001.
45. **Pongas, G., Hamilos, G., Rolston, K.V. & Kontoyiannis, D.P. (2012).** Formal adult infectious disease specialist consultations in the outpatient setting at a comprehensive cancer center. (1998–2008): Diverse and impactful. *Supportive Care in Cancer* **20**:261–265.
46. **Quiles, M.G., Menezes, L.C., Bauab, K.C., Gimpl, E.K., Rocchetti, T.T., Palomo, F.S., Carlesse, F. & Pignatari, A.C.C. (2015).** Diagnosis of bacteremia in pediatric oncologic patients by in-house real-time PCR. *BMC Infectious Diseases* **15**:283.
47. **Quinones-Falconi, F., Galicia-Velasco, M., Marchiaro, P., Mussi, M.A., Ballerini, V., Vila, A.J., Viale, A.M., Bermejo-Morales, K., Limansky, A.S. (2010).** Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing metallo- β -lactamases of the IMP-15 and VIM-2 types in Mexico. *Clinical Microbiology and Infection* **16**:126–131.

48. **Ram, R., Farbman, L., Leibovici, L., Raanani, P., Yeshurun, M., Vidal, L., Gafter-Gvili, A., Peck, A., Shpilberg, O. & Paul, M. (2012).** Characteristics of initial compared with subsequent bacterial infections among hospitalised haemato-oncological patients. *International Journal of Antimicrobial Agents* **40**:123-126.
49. **Rasheed, J.K., Anderson, G.J., Yigit, H., Queenan, A.M., Doménech-Sánchez, A., Swenson, J.M., Biddle, J.W., Ferraro, M.J., Jacoby, G.A. & Tenover, F.C. (2000).** Characterization of the Extended-Spectrum β -lactamase Reference strain., *Klebsiella pneumoniae* K6 (ATCC 700603), which Produces the novel enzyme SHV-18. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**:2382-2388.
50. **Revelas A. (2012).** Healthcare – associated infections: A public health problem. *Nigerian Medical Journal* 2012 Apr-Jun; 53(2): 59–64.
51. **Sader, H.S., Reis, A.O., Silber, S., Gales, A.C. (2005).** IMPs., VIMs., SPMs: the diversity of metallo- β -lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian hospital. *Clinical Microbiology and Infection* **11**:73–76.
52. **Salabi, A.E., Toleman, M.A., Weeks, J., Bruderer, T., Frei, R. & Walsh, T.R. (2010).** First report of the metallo- β -lactamase SPM-1 in Europe. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **54**:582.
53. **Saladin, M., Cao, V.T., Lambert, T., Donay, J.L., Herrmann, J.L., Ould-Hocine, Z., Verdet, C., Delisle, F., Philippon, A., Arlet, G. (2002).** Diversity of CTX-M β -lactamases and their promoter regions from *Enterobacteriaceae* isolated in three Parisian hospitals. *FEMS Microbiology Letters* **209**:161-168.
54. **Santos-Filho, L., Santos, I., Xavier, D.E. & Menezes, L.C. (2003).** Tipagem molecular de amostras de *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de metalo- β -lactamases isoladas em João Pessoa/PB., Brasil. *Revista Brasileira de Analises Clínicas* **35**:127-131.

55. **Shahcheraghi, F., Abbasalipour, M., Feizabadi, M.M., Ebrahimipour, G.H. & Akbari, N. (2011).** Isolation and genetic characterization of metallo- β -lactamase and carbapenamase producing strains of *Acinetobacter baumannii* from patients at Tehran hospitals. *Iranian Journal of Microbiology* **3**:68-74.
56. **Scheffer, M.C., Bazzo, M.L., Steindel, M., Darini, A.L., Clímaco, E. & Dalla-Costa, L.M. (2010).** Intrahospital spread of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a University Hospital in Florianópolis., Santa Catarina., Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **43**:367-371.
57. **Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H. & Swaminathan, B. (1995).** Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology* **33**:2233-2239.
58. **Vasudevan, A., Memon, B.I., Mukhopadhyay, A., Li, J. & Tambyah, P.A. (2015).** The costs of nosocomial resistant gram negative intensive care unit infections among patients with the systemic inflammatory response syndrome- a propensity matched case control study. *Antimicrobial Resistance and Infection Control* **2**:1-8.
59. **Wang, S.S., Lee, N.Y., Hsueh, P.R., Huang, W.H., Tsui, K.C., Lee, H.C., Wu, C.J., Chang, C.M., Huang, C.C., Huang, C.C. & Ko, W.C. (2011).** Clinical manifestations and prognostic factors in cancer patients with bacteremia due to extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* or *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* **44**: 282-288.
60. **Warnke, P., Aepfelbacher, M., Fickenscher, H., Solbach, W., Steinmetz, I. & Podbielski, A. (2014).** Surveillanceberichte zu Erregern und Antibiotikaresistenzen – eine Empfehlung zur Standardisierung. *Deutsche medizinische Wochenschrift* **139**:1377-1382.

61. **Winn, J.R.W.C., Allen, S.D., Janda, W.M., Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P.C. & Woods, G. (2008).** As *Enterobacteriaceae* e Bacilos Gram-Negativos Não-fermentadores. In: Koneman Diagnostico Microbiológico, Texto e Atlas Colorido. 6ª ed. Guanabara Koogan, Brasil, pp 208-386.
62. **Wisplinghoff, H., Seifert, H., Wenzel, R.P. & Edmond, M.B. (2003).** Current trends in the epidemiology of nosocomial bloodstream infections in patients with hematological malignancies and solid neoplasms in hospitals in the United States. *Clinical Infectious Diseases* **36**:1103-1110.
63. **Yigit, H., Queenan, A.M., Anderson, G.J., Domenech-Sanchez, A., Biddle, J.W., Steward, C.D., Alberti, S., Bush, K. & Tenover, F.C. (2001).** Novel Carbapenem-Hydrolyzing β -lactamase., KPC-1., from a CarbapenemResistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; **45**:1151-1161.
64. **Zafer, M.M., Al-Agamy, M.H., El-Mahallawy, H.A., Amin, M.A. & Ashour, A.S.E.D. (2014).** Antimicrobial Resistance Pattern and Their Beta-Lactamase Encoding Genes among *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Cancer Patients. *BioMed Research International* **2014**:8 pages.

5.3 Caracterização clínica e epidemiológica de infecções ocasionadas por *Klebsiella* spp., *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. multidroga resistentes em pacientes com neoplasias sólidas, Pernambuco, Brasil.

Introdução

As infecções relacionadas à assistência a saúde (IRAS) persistem como um problema relacionado aos cuidados a saúde dos pacientes internados, especialmente naqueles imunossuprimidos com câncer, por muitas vezes se manifestar de forma sutil ou atípica, dificultando o diagnóstico e tratamento precoce, e assim, elevando o risco de ocasionar sepse grave e morte (Cornejo-Juárez et al., 2015, Pongas et al., 2012, Gudiol et al., 2011). A emergência global das taxas de infecções relacionadas a bactérias Gram-negativas multidroga resistentes (MDR) em pacientes internados tem sido um fator preocupante por reduzir as opções de tratamento da infecção nos pacientes acometidos (Montassier et al., 2013, Gudiol et al., 2011).

Dentre os microrganismos mais frequentemente associados a IRAS em pacientes oncológicos estão a *Klebsiella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, e *Acinetobacter* spp., os quais apresentam altas taxas de resistência aos antimicrobianos, e são consideradas bactérias MDR de grande importância clínica (Pongas et al., 2012, Andria et al., 2015, Marín et al., 2014). Além das complicações inerentes ao estado de saúde do paciente, as IRAS causadas por patógenos MDR elevam os custos da hospitalização, levando a um impacto econômico significativo (Neidell et al., 2012, Vasudevan et al., 2015)

Muitos estudos envolvendo pacientes com câncer focam na pesquisa de infecção da corrente sanguínea, devido às altas taxas de morbidade e mortalidade (Miedema et al., 2013). Porém, as pneumonias, as infecções do trato urinário, do trato gastrointestinal e da pele/tecidos moles merecem atenção devido à elevada frequência em que ocorrem (Costa,

Atta, Silva 2014). Da mesma forma, poucos estudos são delineados com foco na pesquisa de IRAS exclusivamente em pacientes com neoplasias sólidas (Marín et al., 2014).

Desta forma, este estudo teve por objetivo descrever dados clínicos e epidemiológicos de IRAS ocasionadas por *Klebsiella* spp., *P. aeruginosa*, e *Acinetobacter* spp. em pacientes com neoplasias sólidas e verificar possíveis associações destes fatores com a multidroga resistência.

Métodos

Desenho do estudo: trata-se de um estudo descritivo de corte transversal, onde foram investigadas características relacionadas ao paciente, à hospitalização e à infecção em pacientes com neoplasias sólidas que desenvolveram IRAS causadas por *Klebsiella* spp. ou *P. aeruginosa* ou *Acinetobacter* spp., no período de novembro de 2012 a abril de 2014.

Local do estudo: o estudo foi realizado em um hospital especializado em pacientes com câncer, situado em Recife, Pernambuco, Brasil. O mesmo oferece serviços de urgência 24 horas, Unidade de Terapia Intensiva (UTI), oncologia médica e oncologia cirúrgica, além de quimioterapia, radioterapia, radiologia, odontologia e departamento de próteses reabilitadoras. O mesmo tem a capacidade para atender cerca de 55,0% de todos os pacientes oncológicos do estado de Pernambuco. Durante o período de coleta do estudo, o hospital admitia apenas pacientes com neoplasias sólidas.

População alvo: a população foi constituída por pacientes com neoplasia sólida, de ambos os sexos e todas as idades, admitidos no hospital do estudo no período de novembro de 2012 e abril de 2014, e que desenvolveram IRAS causadas por *Klebsiella* spp. ou *P. aeruginosa* ou *Acinetobacter* spp.

Tamanho amostral: uma amostra mínima de 124 isolados bacterianos foi obtida utilizando o software estatístico Epi-Info (v. 7). Para o cálculo do tamanho amostral foi utilizado, como

estimativa de população sob risco, o número de internamentos por câncer no Brasil, no período de 2008 a 2012 (SIH-SUS), e a estimativa de prevalência de infecções por bacilos Gram-negativos em pacientes com câncer foi baseada no estudo de Costa *et al.* 2014 e intervalo de confiança de 90%.

Análise estatística:

As análises estatísticas foram conduzidas utilizando o software Epi-Info (v. 7). A descrição da amostra foi feita por meio de cálculo de frequência com intervalo de confiança de 95% (IC_{95%}) para as variáveis categóricas e de mediana para as variáveis numéricas. Enquanto que a verificação de possíveis fatores associados à infecção por patógenos MDR foi investigada utilizando teste do qui-quadrado ou teste exato de Fisher para as variáveis categóricas e teste U de Mann-Whitney para as variáveis numéricas, devido a não distribuição normal das mesmas. Foram consideradas estatisticamente significativas as associações com p-valores $\leq 0,05$.

Resultados

No período da pesquisa, foram coletados 169 isolados que se enquadraram dentro do perfil do estudo. Destes, 21 foram perdidos por falta de dados total ou parcial em prontuários, totalizando uma amostra de 148 isolados de *Klebsiella* spp., *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp..

A estatística descritiva dos dados revelou que a frequência de *Klebsiella* spp. (42,6%, IC_{95%} 34,5%- 51,0%) foi significativamente superior a de *Acinetobacter* spp. (23,6%, IC_{95%} 17,1% - 31,3%), não havendo diferença entre *P. aeruginosa* e as mesmas (Tabela 1). Também foi verificada uma predominância estatisticamente significativa de isolados MDR (69,6%, IC_{95%} 61,5% - 76,9%) (Tabela 1) e pacientes do sexo masculino (61,5%, IC_{95%} 53,2% - 69,4%) (Tabela 2).

Tabela 1. Características dos isolados bacterianos provenientes de infecções relacionadas à saúde em pacientes com neoplasias sólidas quanto ao tipo de bactéria, padrão de resistência e sítio do material coletado.

Variáveis	% ^a	IC _{95%} ^b
Bactéria		
<i>Klebsiella</i> spp.	42,6%	34,5% - 51,0%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33,8%	26,2% - 42,0%
<i>Acinetobacter</i> spp.	23,6%	17,1% - 31,3%
Multidroga-resistência		
MDR	69,6%	61,5% - 76,9%
Não-MDR	30,4%	23,1% - 38,5%
Sítio do material coletado		
Aspirado traqueal	41,9%	33,8% - 50,3%
Sangue	17,6%	11,8% - 24,7%
Urina	11,5%	6,8% - 17,7%
Ponta de cateter venoso central	6,1%	2,8% - 11,2%
Outros	23,0%	14,7% - 28,4%

Notas: %^a = Percentual das variáveis categóricas e mediana das variáveis numéricas; IC_{95%}^b = Intervalo de confiança de 95% das variáveis categóricas e valores mínimo e máximo das variáveis numéricas.

Verificou-se ainda que a metade das infecções ocorreu em pacientes com mais de 60 anos (Tabela 2) e em um tempo de internamento superior a 18 dias (Tabela 3). Quanto ao local de internamento, houve diferença significativa entre a internação em UTI (66,89%, IC_{95%} 58,69% - 74,4%) em relação aos demais setores (Tabela 3).

A análise do tipo de neoplasia sólida o câncer de intestino, cólon e reto como o mais frequente (14,9%, IC_{95%} 9,6% - 21,6%), porém, não houve diferença estatisticamente significativa desse com o câncer de mama, câncer de próstata, câncer de laringe, câncer cerebral, câncer de colo de útero e ovário e câncer de bexiga (Tabela 2).

Também foi observado que a ausência de metástase foi predominante (81,1%, IC_{95%} 73,8% - 87,1%), e dentre os casos em que houve metástase, a óssea (7,4%, IC_{95%} 3,8% - 12,9%) foi a mais frequente, porém, não foi significativamente superior às demais (Tabela 2).

Tabela 2. Características clínicas e epidemiológicas de infecções relacionadas à saúde em pacientes com neoplasias sólidas.

Variáveis	% ^a	IC _{95%} ^b
Sexo		
Masculino	61,5%	53,1% - 69,4%
Feminino	38,5%	30,6% - 46,9%
Idade	60	0 - 91
Tipo de neoplasia sólida		
Câncer de intestino, cólon e reto	14,9%	9,6% - 21,6%
Câncer de mama	11,5%	6,8% - 17,7%
Câncer de próstata	11,5%	6,8% - 17,7%
Câncer de laringe	8,8%	4,8% - 14,5%
Câncer cerebral	8,1%	4,3% - 13,7%
Câncer de colo de útero e ovário	6,8%	3,3% - 12,1%
Câncer de bexiga	5,4%	2,4% - 10,4%
Câncer de pulmão	4,7%	1,9% - 9,5%
Câncer de estômago	4,7%	1,9% - 9,5%
Câncer ósseo	4,7%	1,9% - 9,5%
Câncer de boca e lábio	3,4%	1,1% - 7,7%
Outros tipos de câncer	15,5%	10,1% - 22,4%

Tabela 2. Características clínicas e epidemiológicas de infecções relacionadas à saúde em pacientes com neoplasias sólidas. (continuação)

Variáveis	% ^a	IC _{95%} ^b
Metástase		
Sim	18,9%	12,9% - 26,2%
Não	81,1%	73,8% - 87,1%
Tipo de Metástase ^c		
Ossos	7,4%	3,8% - 12,9%
Tireoide	4,1%	1,5% - 8,6%
Fígado	2,7%	0,7% - 6,8%
Pulmão	2,7%	0,7% - 6,8%
Cérebro	1,3%	0,2% - 4,8%
Linfonodos auxiliares	0,7%	0,0% - 3,7%
Sítio da Infecção		
Pulmão	46,6%	38,4% - 55,0%
Corrente sanguínea	23,0%	16,5% - 30,6%
Sítio Urinário	12,2%	7,4% - 18,5%
Sítio Cirúrgico	6,1%	2,8% - 11,2%
Pele/tecidos moles	4,7%	1,9% - 9,5%
Abdômen	7,4%	3,8% - 12,9%

Notas: %^a = Percentual das variáveis categóricas e mediana das variáveis numéricas; IC_{95%}^b = Intervalo de confiança de 95% das variáveis categóricas e valores mínimo e máximo das variáveis numéricas; ^c Três pacientes tiverem dois sítios de metástase, logo, os percentuais para esta variável foram calculados em relação a uma total de 151 casos.

Quanto aos procedimentos invasivos e ao uso de corticoides, foi verificada diferença estatisticamente significativa em relação ao uso dos mesmos (Tabela 3). E no que tange ao uso de agentes antimicrobianos, apenas o uso de antimicrobianos até três meses antes a infecção (42,6%, IC_{95%} 34,5% - 50,9%) não obteve diferença estatisticamente significativa em relação ao uso do fármaco (Tabela 3). Destaca-se ainda que o tratamento inadequado (0,7%, IC_{95%} 0,0% - 3,7%) foi estatisticamente inferiores em relação ao uso adequado dos antimicrobianos e a terapia combinada foi a escolha prioritária no tratamento das infecções (71,6%, IC_{95%} 63,6% - 78,7%) (Tabela 3).

Tabela 3. Características relacionadas à hospitalização e ao tratamento das infecções relacionadas à saúde em pacientes com neoplasias sólidas.

Variáveis	% ^a	IC _{95%} ^b
Tempo de internamento até isolamento do patógeno	18	3 - 733
Local de internamento		
UTI	66,9%	58,7% - 74,4%
Oncologia Médica	15,5%	10,1% - 22,4%
Oncologia Cirúrgica	14,2%	9,0% - 20,9%
Cuidados Paliativos	3,4%	1,1% - 7,7%
Cirurgia		
Sim	76,3%	68,7% - 82,9%
Não	23,6%	17,1% - 31,3%
Tempo de pós-operatório até isolamento do patógeno	11	1 - 154
Uso de dispositivos invasivos		
Ventilação Mecânica		
Sim	62,2%	54,2% - 70,4%
Não	37,8%	29,6% - 45,8%
Acesso Venoso Central		
Sim	70,9%	62,9% - 78,1%
Não	29,1%	21,9% - 37,1%
Acesso Venoso Periférico		
Sim	67,6%	59,4% - 75,0%
Não	32,4%	25,0% - 40,6%
Sonda Vesical de Demora		
Sim	69,6%	61,5% - 76,9%
Não	30,4%	23,1% - 38,5%
Uso de corticoide		
Sim	71,6%	63,6% - 78,7%
Não	28,4%	21,3% - 36,4%
Duração do tratamento com corticoide	5	1 - 27
Uso de antimicrobianos até três meses antes		
Sim	42,6%	34,5% - 50,9%
Não	57,4%	49,1% - 65,5%

Tabela 3. Características relacionadas à hospitalização e ao tratamento das infecções relacionadas à saúde em pacientes com neoplasias sólidas. (continuação)

Variáveis	% ^a	IC _{95%} ^b
Uso de antimicrobianos durante o internamento		
Sim	86,5%	79,9% - 91,5%
Não	13,5%	8,4% - 20,1%
Uso de antimicrobianos no tratamento da infecção		
Sim	100,0%	100,0% - 100,0%
Não	0,0%	0,0% - 0,0%
Adequação do tratamento		
Adequado	99,3%	96,3% - 100,0%
Inadequado	0,7%	0,0% - 3,7%
Tipo de terapia		
Terapia combinada	71,6%	63,6% - 78,7%
Monoterapia	24,3%	17,6% - 32,0%
Não tratado	4,1%	1,5% - 8,6%
Evolução Clínica		
Alta Hospitalar	37,8%	30,0% - 46,2%
Óbito	44,6%	36,4% - 53,0%
Permaneceu internado após cura da infecção	17,6%	11,8% - 24,7%
Óbito relacionado à infecção		
Sim	35,1%	27,5% - 43,4%
Não	11,5%	6,8% - 17,7%
Não se aplica	53,4%	45,0% - 61,6%

Notas: %^a = Percentual das variáveis categóricas e mediana das variáveis numéricas; IC_{95%}^b = Intervalo de confiança de 95% das variáveis categóricas e valores mínimo e máximo das variáveis numéricas; Uso de antimicrobianos durante o internamento = uso de antimicrobianos durante o internamento e antes do isolamento do patógeno incluído nesta pesquisa; Uso de antimicrobianos no tratamento da infecção = uso de antimicrobianos no tratamento da infecção causada pelo patógeno incluído nesta pesquisa.

No que tange ao uso de antimicrobianos ao longo do período analisado, foi observado que, dentre os fármacos utilizados nos três períodos investigados (três meses antes do diagnóstico da infecção, durante o internamento e após o diagnóstico da infecção), houve um aumento estatisticamente significativo do uso de meropenem no tratamento das infecções incluídas neste estudo, em relação aos períodos anteriores, passando de 4,4% (IC_{95%} 1,2% - 10,9%) no período de três meses anteriores para 26,6% (IC_{95%} 21,5% - 32,1%) após o diagnóstico. O mesmo foi observado em relação à amicacina, porém com uma magnitude inferior. Por outro lado, houve uma redução estatisticamente significativa do uso de amoxicilina-ácido clavulânico, cefazolina e ceftriaxona (Tabela 4).

Alguns antimicrobianos não foram usados nos três segmentos de tempo de uso de antimicrobianos analisadas no presente estudo, a exemplo de ampicilina-sulbactam, clindamicina, gentamicina, polimixina B e sulfametoxazol com trimetoprima, que não foram usados no período de três meses anteriores a infecção investigada no presente estudo (Tabela 4).

Os resultados da análise de possíveis medidas de associação entre alguns fatores de exposição e o padrão de resistência dos isolados (multirresistente e não-multirresistente) estão dispostos na tabela 5. Verificou-se que o padrão de multirresistência esteve significativamente associado apenas ao sexo masculino ($p= 0,0465$), tempo de internamento até isolamento do patógeno ($p= 0,0446$), uso de corticoide ($p= 0,0222$), uso de antimicrobiano até três meses antes ($p= 0,0135$) e uso de antimicrobianos durante o internamento e antes do isolamento do patógeno incluído nesta pesquisa ($p= 0,0019$) (Tabela 5).

Tabela 4. Distribuição do uso de antimicrobianos ao longo do período analisado.

Variáveis	Uso de antimicrobianos até três meses antes		Uso de antimicrobianos durante o internamento		Uso de antimicrobianos no tratamento da infecção	
	%	IC _{95%}	%	IC _{95%}	%	IC _{95%}
Amoxicilina-ácido clavulânico	11,0%	5,4% - 19,3%	0,6%	0,1% - 2,3%	0,7%	0,1% - 2,5%
Ampicilina-sulbactam	-	-	2,6%	1,3% - 5,2%	3,1%	1,4% - 5,9%
Piperacilina-tazobactam	15,38%	8,7% - 24,5%	20,1%	16,0% - 24,8%	14,7%	10,8% - 19,3%
Cefalotina	2,2%	0,3% - 7,7%	-	-	-	-
Cefazolina	12,1%	6,2% - 20,6%	11,5%	8,4% - 15,5%	1,4%	0,4% - 3,5%
Ceftazidima	1,1%	0,0% - 6,0%	1,2%	0,4% - 3,2%	-	-
Ceftriaxona	15,4%	8,7% - 24,5%	11,8%	8,7% - 15,8%	2,1%	0,8% - 4,5%
Cefepima	3,3%	0,7% - 9,3%	2,4%	1,1% - 4,8%	1,7%	0,6% - 4,0%
Meropenem	4,4%	1,2% - 10,9%	14,7%	11,2% - 19,1%	26,6%	21,5% - 32,1%
Amicacina	1,1%	0,0% - 6,0%	0,6%	0,1% - 2,3%	4,9%	2,7% - 8,1%
Gentamicina	-	-	0,9%	0,2% - 2,8%	0,7%	0,1% - 2,5%
Ciprofloxacina	12,1%	6,2% - 20,6%	6,8%	4,4% - 10,1%	5,9%	3,5% - 9,3%
Levofloxacino	-	-	0,3%	0,0% - 1,9%	-	-
Moxifloxacino	-	-	2,6%	1,3% - 5,2%	-	-
Clindamicina	-	-	0,9%	0,2% - 2,8%	1,7%	0,6% - 4,0%
Sulfametoxazol – trimetoprima	-	-	0,6%	0,1% - 2,3%	0,3%	0,0% - 1,9%
Azitromicina	7,7%	3,1% - 15,2%	0,3%	0,0% - 1,9%	-	-
Azitromicina-sulfametoxazol	-	-	0,3%	0,0% - 1,9%	-	-
Polimixina B	-	-	5,0%	3,0% - 8,1%	10,8%	7,5% - 15,0%
Teicoplanina	11,0%	5,4% - 19,3%	9,7%	6,9% - 13,5%	13,3%	9,6% - 17,8%

Notas: % = Percentual; IC_{95%} = Intervalo de confiança de 95%, Uso de antimicrobianos durante o internamento = uso de antimicrobianos durante o internamento e antes do isolamento do patógeno incluído nesta pesquisa; Uso de antimicrobianos no tratamento da infecção = uso de antimicrobianos no tratamento da infecção causada pelo patógeno incluído nesta pesquisa.

Tabela 5. Análise univariada dos dados clínicos e epidemiológicos de infecções relacionadas à saúde em pacientes com neoplasias sólidas segundo padrão de resistência.

Variáveis	% MDR	% Não-MDR	p-valor
Bactéria			
<i>Klebsiella</i> spp.	31,1%	40,0%	0,2747
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27,2%	15,6%	
<i>Acinetobacter</i> spp.	41,7%	44,4%	
Sexo masculino	66,0%	51,1%	0,0465*
Idade	60	60	0,6448
Tempo de internamento até isolamento do patógeno	18	16	0,0446*
Local de internamento			
UTI	72,8%	53,3%	0,1238
Oncologia médica	13,6%	20,0%	
Oncologia cirúrgica	10,7%	22,2%	
Cuidados paliativos	2,9%	4,5%	
Tipo de neoplasia sólida			
Câncer de intestino, cólon e reto	17,5%	8,9%	0,1113
Câncer de mama	9,7%	15,6%	
Câncer de próstata	13,6%	6,7%	
Câncer de laringe	11,6%	2,2%	
Câncer cerebral	7,8%	8,9%	
Câncer de colo de útero e ovário	4,8%	11,1%	
Câncer de bexiga	2,9%	11,1%	
Câncer de pulmão	4,8%	4,4%	
Câncer de estômago	3,9%	6,7%	
Cânceres ósseos	3,9%	6,7%	
Câncer de boca e lábio	4,8%	0,0%	
Outros tipos de câncer	8,7%	15,6%	
Metástase	18,4%	20,0%	0,4949
Cirurgia	76,5%	73,3%	0,3411
Tempo de pós-operatório até isolamento do patógeno	11	14	0,8101
Uso de corticoide	76,7%	60,0%	0,0222*
Duração do tratamento com corticoide	5	5	0,9506
Uso de antimicrobiano até três meses antes	48,5%	28,9%	0,0135*
Uso de antimicrobianos durante o internamento	92,2%	73,3%	0,0019**
Uso de antimicrobianos no tratamento da infecção	100,0%	100,0%	1,0000
Tratamento inadequado	1,0%	0,0%	0,6959
Tipo de terapia			
Terapia combinada	70,9%	73,3%	0,9193
Monoterapia	25,2%	22,2%	
Não tratado	3,9%	4,5%	
Evolução clínica			
Alta hospitalar	39,8%	33,3%	0,1572
Óbito	46,6%	40,0%	
Permaneceu internado após cura da infecção	13,6%	26,7%	

Tabela 5. Análise univariada dos dados clínicos e epidemiológicos de infecções relacionadas à saúde em pacientes com neoplasias sólidas segundo padrão de resistência. (continuação)

Variáveis	% MDR	% Não-MDR	p-valor
Óbito relacionado à infecção			
Sim	34,0%	37,8%	0,4739
Não	13,6%	6,6%	
Não se aplica	52,4%	55,6%	
Uso de dispositivos invasivos			
Ventilação Mecânica	59,8%	68,9%	0,1511
Acesso Venoso Central	72,8%	66,7%	0,2273
Acesso Venoso Periférico	66,0%	71,1%	0,2770
Sonda Vesical de Demora	71,8%	64,4%	0,1879
Sítio da infecção			
Pulmão	49,6%	40,0%	0,3240
Corrente sanguínea	25,3%	17,8%	
Sítio Urinário	11,6%	13,3%	
Sítio Cirúrgico	4,8%	8,9%	
Pele/tecidos moles	3,9%	6,7%	
Abdômen	4,8%	13,3%	
Sítio do material coletado			
Aspirado traqueal	45,6%	33,3%	0,2927
Sangue	16,5%	20,0%	
Urina	11,6%	11,1%	
Ponta de cateter	7,8%	2,3%	
Outros	18,5%	33,3%	

Notas: MDR = isolados multidroga resistentes; Não-MDR = isolados não multidroga resistentes; Uso de antimicrobianos durante o internamento = uso de antimicrobianos durante o internamento e antes do isolamento do patógeno incluído nesta pesquisa; Uso de antimicrobianos no tratamento da infecção = uso de antimicrobianos no tratamento da infecção causada pelo patógeno incluído nesta pesquisa; % = Percentual das variáveis categóricas e mediana das variáveis numéricas; * p< 0,05; ** p< 0,01.

Discussão

Apesar da escassez de estudos que abordam a epidemiologia de IRAS exclusivamente em pacientes com neoplasias sólidas, alguns estudos foram delineados incluindo pacientes com neoplasias hematológicas e sólidas, com o objetivo de verificar fatores de risco para mortalidade, infecção por bactérias MDR ou mesmo prognóstico e tratamento de pacientes infectados (Andria et al., 2015, Cornejo-Juárez et al., 2015, Costa; Ata, Silva 2015, Gudiol et al., 2011, Pongas et al., 2012, Samonis et al., 2013).

Em um estudo abrangente que verificou a epidemiologia, antibioticoterapia e outros resultados de infecções ocasionada por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas em pacientes com neoplasias sólidas, Marín et al. (2014) focaram a pesquisa em infecções de corrente sanguínea, por elevar as taxas de morbidade e mortalidade de pacientes com câncer, além de prolongar o tempo de hospitalização do paciente. No entanto, corroborando com nossos achados, outros estudos realizados com pacientes com neoplasias hematológicas e sólidas verificaram que as pneumonias foram mais frequentes que as infecções de corrente sanguínea (Cornejo-Juárez et al., 2015, Costa; Atta; Silva, 2015, Pongas et al., 2012). Por este motivo, o presente estudo foi delineado para investigar as características de IRAS ocasionadas por *Klebsiella* spp., *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. em pacientes com neoplasias sólidas e abrangendo os diversos sítios de infecção, pacientes de todas as idades e internados em qualquer setores do hospital, com o objetivo de ampliar o conhecimento a respeito das IRAS nos pacientes com neoplasia sólida e verificar possíveis fatores que possam estar associados a multirresistência das bactérias .

Os patógenos analisados no presente estudo foram selecionados por estarem frequentemente associados a padrões de multirresistência e devido à alta prevalência dos mesmos relacionados às IRAS nos hospitais de uma forma geral. Estudos com pacientes oncológicos apontam que *Klebsiella* spp., *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. estão entre os patógenos mais frequentemente relacionados às IRAS (Andria et al., 2015, Cornejo-Juárez et al., 2015, Costa; Atta; Silva, 2015, Marín et al., 2014).

O percentual de MDR detectado no presente estudo foi elevado (69,7%, IC_{95%} 61,5% - 76,9%) em relação a Marín et al. (2014), que detectou este perfil em apenas 13,0% dos isolados investigados. Contudo, diversos estudos utilizaram o padrão MDR como critério de seleção dos isolados incluídos nas pesquisas (Gudiol et al., 2011, Cornejo-Juárez et al., 2015, Costa; Atta; Silva, 2015)

No tratamento das infecções, o aumento progressivo do uso de meropenem pode ser justificado pela elevada frequência de MDR, no entanto este é um fator preocupante devido à elevação da resistência a estes antimicrobianos, desencadeada principalmente pela produção de enzimas carbapenemase (Wollheim et al., 2011). Os antimicrobianos mais utilizados no tratamento destes patógenos no presente estudo foram meropenem (26,6%, IC_{95%} 21,5% - 32,1%) e piperacilina-tazobactam (14,7%, IC_{95%} 10,8% - 19,3%), respectivamente. Em um estudo clínico que comparou o risco de morte em pacientes com bacteriemia ocasionada por isolados produtoras de β -lactamase de espectro estendido (ESBL), tratados empiricamente com carbapenêmico ou piperacilina-tazobactam e verificaram que o risco de morte ajustado foi 1,92 vezes maior para pacientes que recebem tratamento empírico com piperacilina-tazobactam comparado com a terapia empírica com carbapenêmicos (IC_{95%} 1,1-3,5) (Tamma et al., 2015). Outro estudo relevante foi realizado por Klasterskya e Georgala (2014), os quais investigaram estratégias de tratamento empírico de infecção em pacientes oncológicos, com ênfase no aparecimento de bactérias Gram-negativas resistentes e concluíram que diante do desafio advindo da emergência de microrganismos MDR, é recomendado o uso de terapias combinadas de antimicrobianos, ou mesmo a utilização de "veteranos", como as polimixinas. Essa conduta terapêutica foi adotada no presente estudo, onde a terapia combinada foi a principal escolha (71,6%, IC_{95%} 63,6% - 78,7%) e a polimixina foi o quarto antimicrobiano mais utilizado no tratamento dos pacientes (10,8%, IC_{95%} 7,5% - 15,0%).

Quanto ao tipo de neoplasia sólida, o presente estudo detectou que as cinco neoplasias sólidas mais frequentes foram câncer de intestino, cólon e reto, de mama, de próstata, laringe e cerebral. Este resultado depende diretamente do perfil de internamento do hospital, logo, difere de outros estudos realizados em outros países por apresentarem perfis de internamento distintos (Cornejo-Juárez et al., 2015; Gao et al., 2015; Marín et al., 2014; Pongas et al., 2012).

Em relação ao estudo de fatores associados à infecção ocasionada por isolados MDR comparados aos não-MDR, Andria et al. (2015) investigaram a carga de mortalidade relacionada com a infecção provocada por bactérias Gram-negativas resistentes aos carbapenêmicos (BGNRC) entre os pacientes com câncer hematológicas. Anteriormente a análise dos fatores de risco relacionados ao óbito, foi feita uma univariada com o intuito de verificar que fatores estão associados à infecção por (BGNRC) e detectaram que o tratamento prévio com carbapenêmicos até 30 dias anteriores a infecção estudada estavam associados à infecção por BGNRC, semelhante ao presente estudo que detectou associação entre o uso prévio de antimicrobianos durante o internamento e até três meses antes a infecção investigada.

Em outro estudo, Costa; Atta; Silva (2015) investigaram os fatores de risco e resultados associados às infecções por bactérias multirresistentes Gram-negativas em uma unidade de oncologia de terapia intensiva pediátrica (UTIP). Neste, foram agrupados na mesma análise os pacientes acometidos por neoplasias sólidas e hematológicas. O resultado da análise univariada de Costa; Atta; Silva (2015) revelou que o uso de corticoide anterior à infecção não estava associado ao surgimento de infecções causadas por isolados MDR, divergindo do resultado encontrado no presente estudo. Em contrapartida, a maior frequência de isolados MDR e o tratamento antimicrobiano anterior à infecção acompanhada no estudo apresentaram associação com o surgimento de infecção por isolados Gram-negativos MDR, corroborando com os achados do presente estudo.

Semelhantemente, Cornejo-Juárez et al. (2015) investigaram o impacto das infecções hospitalares com bactérias multirresistentes em unidade de terapia intensiva oncologia agrupando pacientes com neoplasia sólida e hematológica na mesma análise. Estes pesquisadores verificaram que o uso prévio de ventilação mecânica e a mortalidade relacionada às IRAS por patógenos MDR foram significativamente maiores quando

comparados às IRAS por patógenos não-MDR, divergindo da presente pesquisa. Porém, a maior frequência de isolados MDR na amostra, corrobora com os achados do presente estudo.

O presente estudo apresenta como limitação metodológica o viés de informação, por ter sido realizado por meio de análise de prontuário clínico, podendo ter ocorrido ausência ou falha em informações necessárias.

Contudo, o presente estudo mostrou que além do tempo de internamento transcorrido até o diagnóstico da infecção e o uso prévio de antimicrobianos estão associados à multirresistência nos patógenos investigados, reforçando a importância destes fatores de risco já preconizados no acompanhamento dos pacientes. Desta forma, faz-se necessária a monitorização contínua de patógenos nos diversos sítios de infecção em pacientes com câncer internados por longos períodos, bem como adoção de medidas de controle para minimizar os riscos de IRAS, a fim de melhorar os cuidados prestados a estes pacientes.

Conformidade com as Normas Éticas

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética e pesquisa com seres humanos do Hospital do Câncer de Pernambuco (CAAE 05554812.7000.5205).

Referências

1. Cornejo-Juárez P, Vilar-Compte D, Pérez-Jiménez C, Ñamendys-Silva SA, Sandoval-Hernández S, Volkow-Fernández P. The impact of hospital-acquired infections with multidrug-resistant bacteria in an oncology intensive care unit. *International Journal of Infectious Diseases* 2015; 31:31–34.
2. Pongas G, Hamilos G, Rolston KV, Kontoyiannis DP. Formal adult infectious disease specialist consultations in the outpatient setting at a comprehensive cancer center

- (1998–2008): Diverse and impactful. *Supportive Care in Cancer* 2012; 20:261–265. doi 10.1007/s00520-010-1065-9.
3. Montassier E, Batard E, Gastinne T, Potel G, de la Cochetière MF. Recent changes in bacteremia in patients with cancer: asystematic review of epidemiology and antibiotic resistance. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 2013; 32:841-850.
 4. Gudiol C, Tubau F, Calatayud L, Garcia-Vidal C, Cisnal M, Sánchez-Ortega I, et al. Bacteraemia due to multidrug-resistant Gram-negative bacilli in cancer patients: risk factors, antibiotic therapy and outcomes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2011; 66:657-663.
 5. Andria N, Henig O, Kotler O, Domchenko A, Oren I, Zuckerman T, Ofra Y, Fraser D, Paul M (2015) Mortality burden related to infection with carbapenem-resistant Gram-negative bacteria among haematological cancer patients: a retrospective cohort study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2015; 70:3146-3153. doi: 10.1093/jac/dkv218
 6. Marín M, Gudiol C, Garcia-Vidal C, Ardanuy C, Carratalà J (2014) Bloodstream infections in patients with solid tumors: epidemiology, antibiotic therapy, and outcomes in 528 episodes in a single cancer center. *Medicine (Baltimore)* 93:143-9. doi: 10.1097/MD.0000000000000026.
 7. Neidell MJ, Cohen B, Furuya Y, Hill J, Jeon CY, Glied S, Larson EL. Costs of healthcare- and community-associated infections with antimicrobial resistant versus antimicrobial-susceptible organisms. *Clinical infectious diseases* 2012; 55:807–815. doi: 10.1093/cid/cis552.
 8. Vasudevan A, Memon BI, Mukhopadhyay A, Li J, Tambyah PA. The costs of nosocomial resistant Gram-negative intensive care unit infections among patients with

- the systemic inflammatory response syndrome- a propensity matched case control study. *Antimicrobial Resistance and Infection Control* 2015; 2:1-8. doi: 10.1186/s13756-015-0045-8.
9. Miedema KG, Winter RH, Ammann RA, Droz S, Spanjaard L, de Bont ES, Kamps WA, van de Wetering MD, Tissing WJ. Bacteria causing bacteriemia in pediatric cancer patients presenting with febrile neutropenia--species distribution and susceptibility patterns. *Supportive Care in Cancer* 2013; 21:2417-2426. doi: 10.1007/s00520-013-1797-4.
 10. Costa PO, Atta EH, Silva ARA. Infection with multidrug-resistant Gram-negative bacteria in a pediatric oncology intensive care unit: risk factors and outcomes. *Jornal de Pediatria* 2015; 91:435-441.
 11. CDC. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, 2013. (<http://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>). Accessed: 15 April 2014.
 12. Samonis G, Vardakas KZ, Maraki S, Tansarli GS, Dimopoulou D, Kofteridis DP, Andrianaki AM, Falagas ME. A prospective study of characteristics and outcomes of bacteriemia in patients with solid organ or hematologic malignancies. *Supportive Care in Cancer*. 2013 21:2521-2526. doi: 10.1007/s00520-013-1816-5.
 13. Wollheim C, Guerra IM, Conte VD, Hoffman SP, Schreiner FJ, Delamare AP, Barth AL, Echeverrigaray S, da Costa SOP. Nosocomial and community infections due to class A extended-spectrum β -lactamase (ESBLA)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in southern Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2011, 15:138-143. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-86702011000200008>.
 14. Tamma PD, Han JH, Rock C, Harris AD, Lautenbach E, Hsu AJ, Avdic E, Cosgrove SE. Carbapenem Therapy is Associated with Improved Survival Compared to

- Piperacillin-Tazobactam for Patients with ESBL Bacteremia. *Clinical Infectious Disease* 2015, 60:1319-25. doi: 10.1093/cid/civ003.
15. Klasterskya K, Georgala A. Strategies for the empirical management of infection in cancer patients with emphasis on the emergence of resistant Gram-negative bacteria. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2014, 92:268–278.
16. Gao Y, Liu Y, Ma X, Wei L, Chen W, Song L. The incidence and risk factors of peripherally inserted central catheter-related infection among cancer patients. *Therapeutics and Clinical Risk Management* 2015, 11:863–871. doi: 10.2147/TCRM.S83776.

6. Conclusões

O presente estudo identificou um elevado perfil de multirresistência entre os patógenos investigados e verificou possíveis fatores associados a este padrão. Estes resultados podem dar suporte à epidemiologia das IRAS em pacientes com neoplasias sólidas, bem como pode ser uma ferramenta útil para direcionar estratégias para reduzi-las. Para tal, faz-se necessária a monitorização contínua de patógenos envolvidos em IRAS em pacientes com câncer internados por longos períodos, a fim de melhorar os cuidados prestados a estes pacientes.

REFERÊNCIAS

- Agarwal, G.; Kapil, A.; Kabra, S. K.; Kumar, B.; Dwivedi S. N. **Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from chronically infected children with cystic fibrosis in India.** BioMed Center Microbiology, v. 5, p. 1-11, 2005.
- Alexandre, J. I. F. **Perfil de Resistência a Antibióticos em Isolados de Doentes Oncológicos.** Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro. Lisboa, Portugal, 126p. 2010.
- Alves, M. S.; Dias, R. C. S.; Castro, A. C. D.; Riley, L. W.; Moreira, B. M. **Identification of Clinical Isolates of Indole-Positive and Indole-Negative *Klebsiella* spp.** Journal Of Clinical Microbiology, v. 44, n. 10, p. 3640-3646, 2006.
- Aly, N.Y.; Al-Mousa, H.H.; Al-Asar-el S.M. **Nosocomial infections in a medical-surgical intensive care unit.** Medical Principle Practice, v. 17, n. 5, p. 373–377, 2008.
- Ambler, R.P. **The structure of beta-lactamases.** Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences Royal Society. v, 289, p. 321-331, 1980.
- Andria, N.; Henig, O.; Kotler, O.; Domchenko, A.; Oren, I.; Zuckerman, T.; Ofran, Y.; Fraser, D.; Paul, M. **Mortality burden related to infection with carbapenem-resistant Gram-negative bacteria among haematological cancer patients: a retrospective cohort study.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 70 p. 3146-3153, 2015.
- Arbeit, R. D. **Laboratory producer for the epidemiologic analysis of microorganisms.** In: Murray, P. R.; Baron, E. J.; Pfaller, M. A.; Tenover, F. C.; Tenover, R. H. Manual of Clinical Microbiology, 7 ed., p. 116-137, 1999.
- Bassetti, M.; Righi, E. **Multidrug-resistant bacteria: what is the threat? Hematology.** American Society of Hematology Education Program. v, 2013, p. 428-432, 2013.
- Bert, F.; Branger, C.; Lambert-Zechovsky. **Identification of PSE and OXA beta-lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR-restriction fragment length polymorphism.** Journal of Antimicrobial and Chemotherapy, v. 50, p. 11–18, 2002.
- Bonnet, R. **Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes.** Antimicrob Agents Chemother, v. 48, n. 1, p. 1-14, 2004.
- Bow, E.J. **Fluoroquinolones, antimicrobial resistance and neutro-penic cancer patients.** Current Opinion in Infectious Diseases, v. 24, n. 6, p. 545-553, 2011.

- Bow, E.J. **There should be no ESKAPE for febrile neutropenic cancer patients: the dearth of effective antibacterial drugs threatens anticancer efficacy.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 68, n. 3, p. 492-495, 2013.
- Brown, S.; Young, H. K.; Amyes, S. G. B. **Characterisation of OXA-51, a novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of *Acinetobacter baumannii* from Argentina.** Clinical Microbiology and Infection, v. 11, n. 1, p. 15-23, 2005.
- Bradford, P. A. **Extended-Spectrum β -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat.** Clinical Microbiology Reviews, v. 14, n. 4, p. 933-951, 2001.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise da Situação de Saúde. **Sistema de informações sobre mortalidade (SIM).** Brasília, DF: MS, 2015. Disponível em: <<http://www.datasus.gov.br>>. Acesso em: 25 nov, 2015.
- Bucaneve, G.; Micozzi, A.; Menichetti, F.; Martino, P.; Dionisi, M. S.; Martinelli, G.; Allione, B.; D'Antonio, D.; Buelli, M.; Nosari, A. M.; Cilloni, D.; Zuffa, E.; Cantaffa, R.; Specchia, G.; Amadori, S.; Fabbiano, F.; Deliliers, G. L.; Lauria, F.; Foa, R.; Del Favero, A. **Levofloxacin to Prevent Bacterial Infection in Patients with Cancer and Neutropenia.** The New England Journal of Medicine, v. 353, n. 10, p. 977-987, 2005.
- Bush, K, Jacoby, G. A. **Updated Functional Classification of β -Lactamases.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 54, n. 3, p. 969–976, 2010.
- Cabral AB, Melo RCA, Maciel MAV, Lopes ACS. **Multidrug resistance genes, including blaKPC and blaCTX-M-2, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 45, p. 572-578, 2012.
- Castanheira, M.; Toleman, M. A.; Jones, R.N.; Schmidt, F.J.; Walsh, T.R. **Molecular characterization of a betalactamase gene, blaGIM-1, encoding a new subclass of metallo-b-lactamase.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 48, n.12, p. 4654-61, 2004.
- Cataneo, C.; Canini, S. R. M. S.; Castro, P. T. O.; Hayashida, M.; GIR, E. **Avaliação da sensibilidade e da especificidade dos critérios para isolamento de pacientes admitidos em um hospital especializado em oncologia.** Revista Latino-Americana de Enfermagem. v, 19, n. 5, p. 1-8, 2011.

- Cavalcante, N. J. F. **Infecção em paciente imunologicamente comprometido.** In: Fernandes AT. Infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde. São Paulo (SP): Atheneu. p. 670-682, 2000.
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **About Antimicrobial Resistance: A Brief Overview,** Atlanta, 2010. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>>. Acesso em: 15 ago, 2014.
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013.** Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, 2013. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>>. Acesso em: 15 ago, 2014.
- Chaudhary, M.; Payasi, A. **Molecular characterization and in vitro susceptibilities of β -lactamase producing *Escherichia coli*, *Klebsiella* species, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* to CSE1034 and other β -lactams.** Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, v. 7S1 p. S217-23, 2014.
- Chuang, Y. C.; Sheng, W. H.; Li, S. Y.; Lin, Y.; Wang, J. T.; Chen, Y. C.; Chang, S. C. **Influence of genospecies of *Acinetobacter baumannii* complex on clinical outcomes of patients with acinetobacter bacteremia.** Clinical Infectious Diseases, v. 52, n. 3, p. 352–360, 2011.
- CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.** Doc M100-S19, V. 30, n.1, 2009.
- CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility. Testing, Twenty-Fourth Informational Supplement. CLSI document M100-S24.** Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, pp50-63, 2014.
- Chandra, V.; Goswami, P.N. **Detection of *tem* & *shv* genes in extended spectrum beta lactamase (ESBL) producing *E.coli* & *Klebsiella pneumoniae* isolated from a tertiary care cancer hospital.** National Journal of Medical Research. v. 4, n. 3, p. 201 – 204, 2014.
- Cornejo-Juárez, P.; Vilar-Compte, D.; Pérez-Jiménez, C.; Ñamendys-Silva, S.A.; Sandoval-Hernández, S.; Volkow-Fernández, P. **The impact of hospital-acquired infections with multidrug-resistant bacteria in an oncology intensive care unit.** International Journal of Infectious Diseases, v. 31, p. 31–34, 2015.

- Costa, P.O.; Atta, E.H.; Silva, A.R.A. **Infection with multidrug-resistant Gram-negative bacteria in a pediatric oncology intensive care unit: risk factors and outcomes.** *Jornal de Pediatria*, v. 91 p. 435-441, 2015
- Dong, F.; Xu, X.W.; Song, W.Q.; Lü, P.; Yu, S.J.; Yang, Y.H.; Shen, X.Z. **Characterization of multidrug-resistant and metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a paediatric clinic in China.** *Chinese Medical Journal*. v, 121, p. 1611-1616, 2008.
- Duan, H.; Chai, T.; Liu, J.; Zhang, X.; Qi, C.; Gao, J.; Wang, Y.; Cai, Y.; Miao, Z.; Yao, M.; Schlenker, G. **Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR.** *Environmental research*. v, 109, p.511–517, 2009.
- Fernandes, T.A.; Pereira, C.A.P.; Petrili, A.S.; Pignatari, A.C.C. **Caracterização molecular de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos e produtoras de metalo- β -lactamase isoladas em hemoculturas de crianças e adolescentes com câncer.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 43, n. 4, p. 372-376, 2010.
- Ferreira, A. E.; Marchetti, D. P.; Cunha, G. R.; Oliveira, L. M.; Fuentefria, D. B.; Dall Bello, A. G.; Barth, A. L.; Corção, G. **Molecular characterization of clinical multiresistant isolates of *Acinetobacter* sp. from hospitals in Porto Alegre, State of Rio Grande do Sul, Brazil.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 44, n. 6, p. 725-730, 2011.
- Ferreira, A. M. T.; Suzart, S.; Vidotto, O.; Knowles, D. P.; Vidotto, M. C. **Use of repetitive DNA elements to define genetic relationships among *Anaplasma marginale* isolates.** *FEMS Microbiology Letters*, v. 197, n. 2, p. 139-143, 2001.
- Freitas, A. L.; Barth, A. L. **Typing of *Pseudomonas aeruginosa* from hospitalized patients: a comparison of susceptibility and biochemical profiles with genotype.** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 37, n. 1, p. 77-82, 2004.
- Gales, A. C.; Menezes, L. C.; Silbert, S.; Sader, H. S. **Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenêmicos-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase.** *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, v. 52, p. 699-702, 2003.

- Gales, A.C.; Menezes, L.C.; Silbert, S.; Sader, H.S. **Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenêmicos-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 52:699 – 702, 2003.
- Ghamgosha, M.; Zahedani, S. S.; Kafilzadeh, F.; Bameri, Z. **Metallo- β -lactamase genes VIM-1, SPM-1 and IMP-1 in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Zahedan Hospitals.** International Journal of Infectious, v. 1, p. e19635, 2014.
- González, L. J.; Moreno, D. M.; Bonomo, R. A.; Vila, A. J.. **Host-specific enzyme-substrate interactions in SPM-1 metallo- β -Lactamase are modulated by second sphere residues.** PLOS Pathogens, v. 10, n. 1, p. e1003817, 2014.
- Gudiol, C.; Calatayud, L.; Garcia-Vidal, C.; Lora-Tamayo, J.; Cisnal, M.; Duarte, R.; Arnan, M.; Marin, M.; Carratala, J.; Gudiol, F. **Bacteraemia due to extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* (ESBL-EC) in cancer patients: clinical features, riskfactors, molecular epidemiology and outcome.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 65, p. 333–341, 2010.
- Gudiol, C.; Calatayud, L.; Garcia-Vidal, C.; Lora-Tamayo, J.; Cisnal, M.; Duarte, R.; Arnan, M.; Marin, M.; Carratalà, J.; Gudiol, F. **Bacteraemia due to multidrug-resistant Gram-negative bacilli in cancer patients: risk factors, antibiotic therapy and outcomes.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 66, p. 657-663, 2011.
- Gudiol, C.; Bodro, M.; Simonetti, A.; Tubau, F.; González-Barca, E.; Cisnal, M.; Domingo-Domenech, E.; Jiménez, L.; Carratalà, J. **Changing aetiology, clinical features, antimicrobial resistance, and outcomes of bloodstream infection in neutropenic cancer patients.** Clinical Microbiology and Infection, v.19, n. 5, p. 474 – 479, 2013.
- Gupta, S. K.; Nalluswami, K.; Snider, C.; Perch, M.; Balasegaram, M.; Burmeister, D.; Lockett, J.; Sandt, C.; Hoekstra, R. M.; Montgomery, S. **Outbreak of *Salmonella* Braenderup infections associated with Roma tomatoes, northeastern United States, 2004: a useful method for subtyping exposures in field investigations.** Epidemiology and Infection, v. 135, n. 7, p. 1165-1173, 2007.
- Hæggman, S.; Löfdahl, S.; Paauw, A.; Verhoef, J.; Brisse, S. **Diversity and evolution of the class A chromosomal β -lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 48, n. 7, p. 2400-2408, 2004.

- Hafiane, A.; Ravaoarinoro, M. **Différentes méthodes de typage des souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées des patients atteints de mucoviscidose.** Médecine et maladies infectieuses, v. 38, n. 5, 238–247, 2008.
- Haryani, Y.; Noorzaleha, A.S.; Fatimah, A.B.; Noorjahan, B.A.; Patrick, G.B.; Shamsinar, A.T.; Laila, R.A.S.; Son, R. **Incidence of *Klebsiella pneumonia* in street foods sold in Malaysia and their characterization by antibiotic resistance, plasmid profiling, and RAPD–PCR analysis.** Food Control, v. 18, n. 7, p. 847-853, 2007.
- Henriksen, S. D. ***Moraxella*, *Acinetobacter*, and the *Mimeae*.** Bacteriological reviews, v. 37, n. 4, p. 522-561, 1973.
- Hirsch, E.B, Tam,, v. H. **Impact of Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on Patient Outcomes.** Expert Review of Pharmacoeconomics & Outcomes Research . v, 10, n. 4, p. 441-451, 2010.
- Horan, T. C.; Andrus, M.; DUDECK, M.A. **CDC/NHSN surveillance definition of health care–associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting.** American Journal of Infection Control, v. 36, p. 309-332, 2008.
- Hussain, M.; Carlino, A.; Madonna, M.J.; Lampen, J.O. **Cloning and sequencing of the metallothioprotein β -lactamase II gene of *Bacillus cereus* 569/H in *Escherichia coli*.** Journal of Bacteriology, v.164, n.1, p.223-229, 1985.
- INCA, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva.** Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2014, 124p.
- Jacoby, G. A; Bush K. **β -Lactamase Nomenclature.** Journal of Clinical Microbiology, v.43, n.12, p.6220, 2005.
- Jacoby, G. A.; Bush, K. **β -Lactamase classification and amino acid sequences for TEM.; SHV and OXA extended-spectrum and inhibitor resistant enzymes. Burlington: Lahey Clinic 2015.** Disponível em: <www.lahey.org/studies/>. Acesso em: 07 jul, 2015.
- Jacoby G. A.; Muñoz-Price, L. S. **The new β -lactamases.** New England Journal of Medicine, v. 352, p. 380-391, 2005.
- Jácome, P.R.L.A.; Alves, L.R.; Cabral, A.B.; Lopes, A.C.S.; Maciel, M.A.V. **First Report of KPC-Producing *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 56, n. 9, p. 4990, 2012.

- Jones, R. N.; Biedenbach, D. J.; Sader, H. S.; Fritsche, T. R.; Toleman, M. A.; Walsh, T. R. **Emerging epidemic of metallo- β -lactamase-mediated resistance.** Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, v.51, p.77-84, 2005.
- Kitchel, B.; Rasheed, J. K.; Endimiani, A.; Hujer, A. M.; Anderson, K. F.; Bonomo, R. A.; Patel, J. B. **Genetic Factors Associated with Elevated Carbapenem Resistance in KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*.** Antimicrob Agents Chemother, v. 54, n. 10, p. 4201-4207, 2010.
- Kiska, D. L.; Gilligan, P. H. ***Pseudomonas*.** In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover MC, editors. Manual of Clinical Microbiology. Washington D.C., American Society for Microbiology, p. 719-728, 2003.
- Kumar, A.; Ellis, P.; Arabi, Y.; Roberts, D.; Light, B.; Parrillo, J.E.; Dodek, P.; Wood, G.; Kumar, A.; Simon, D.; Peters, C.; Ahsan, M.; Chateau, D.; Cooperative Antimicrobial Therapy of Septic Shock Database Research Group. **Initiation of inappropriate antimicrobial therapy results in a fivefold reduction of survival in human septic shock.** Chest. v, 136, n. 5, p. 1237–1248, 2009.
- Larsson, K.; Björkstrand, B.; Ljungman, P. **Faster engraftment but no reduction in infectious complications after peripheral blood stem cell transplantation compared to autologous bone marrow transplantation.** Supportive Care in Cancer, v. 6, p. 378–383, 1998.
- Leal, C. R. B. Uso da ERIC-PCR para caracterização de amostras de *Leishmania chagasi*. [Tese]. Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2010.
- Leavitt, A.; Navon-Venezia, S.; Chmelnitsky, I.; Schwaber, M. J.; Carmeli, Y. **Emergence of KPC-2 and KPC-3 in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains in an Israeli hospital.** Antimicrobial Agents Chemotherapy, v. 51, p. 3026–3029, 2007.
- Lee, J. Y.; Limb, M. H.; Heoc, S. T.; Koa, K. S. **Repeated isolation of *Pseudomonas aeruginosa* isolates resistant to both polymyxins and carbapenems from 1 patient.** Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, v. 72, p. 267-271, 2012.
- Livermore, D. M.; Woodford, N. **The beta-lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*.** Trends in Microbiology. v, 14, p. 413-420, 2006.
- Livermore, D. M. **Defining an extended-spectrum beta-lactamase.** Clin. Microbiol. Infect. 14 Suppl 1:3-10, 2008.

- Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Parker, J. **Microbiologia de Brock**. São Paulo: Prentice Hall, p. 348-51, 2004.
- Madruga, C. R.; Leal, C. R. B.; Ferreira, A. M. T.; Araújo, F. R.; Bonato, A. L. V.; Kessler, R. H.; Schenk, M. A. M.; Soares, C. O. **Genetic and antigenic analysis of Babesia bigemina isolates from five geographical regions of Brazil**. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 22, n. 4, p. 153-160, 2002.
- Marín, M.; Gudiol, C.; Garcia-Vidal, C.; Ardanuy, C.; Carratalà, J. **Bloodstream infections in patients with solid tumors: epidemiology, antibiotic therapy, and outcomes in 528 episodes in a single cancer center**. Medicine, v. 93, p. 143-9, 2014.
- Maschmeyer, G.; Haas, A. **The epidemiology and treatment of infections in cancer patients**. International Journal of Antimicrobial Agents, v. 31 p. 193-197, 2008.
- Mendes, R.E.; Castanheira, M.; Pignatari, A.C.C.; Gales, A.C. **Metalo- β -lactamases**. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, v.42, n. 2, p. 103-113, 2006.
- Montassier, E.; Batard, E.; Gastinne, T.; Potel, G.; de La Cochetière, M.F. **Recent changes in bacteriemia in patients with cancer: a systematic review of epidemiology and antibiotic resistance**. European journal of clinical microbiology & infectious diseases, v. 32, n. 7, p. 841-850, 2013.
- Montefour, K.; Frieden, J.; Hurst, S.; Helmich, C.; Headley, D.; Martin, M.; Boyle, D. A. **Acinetobacter baumannii: an emerging multidrug-resistant pathogen in critical care**. Critical Care Nurse, v. 28, n. 1, p. 15-25, 2008.
- Monteiro, J.; Santos, A. F.; Asensi, M. D.; Peirano, G.; Gales, A. C. **First Report of KPC-2-Producing Klebsiella pneumoniae Strains in Brazil**. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 53, n. 1, p. 333–334, 2009.
- Motta, F. A. **Avaliação de Métodos Moleculares de Tipagem se Isolados Nosocomiais de Pseudomonas aeruginosa Resistentes a Carbapenêmicos**. [Dissertação]. Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Pontifícia Universidade Católica do Paraná, 2006.
- Mugnier, P.D.; Poirel, L.; Naas, T.; Nordmann, P. **Worldwide dissemination of the blaOXA-23 carbapenemase gene of Acinetobacter baumannii**. Emerg Infect Dis. v. 16, p. 35–40. 2010.
- Mulvey, M. R.; Simor, A. E. **Antimicrobial resistance in hospitals: How concerned should we be?** Canadian Medical Association Journal, 180, 408-415, 2009.
- Murray, P. R.; Rosenthal, K. S.; Pfaller, M. A. **Microbiologia médica**. [tradução Taborda, C. P. et al.]. – Rio de Janeiro:Ed. Elsevier, 2009.

- Nagao, M.; Iinuma, Y.; Igawa, J.; Saito, T.; Yamashita, K.; Kondo, T.; Matsushima, A.; Takakura, S.; Takaori-Kondo, A.; Ichiyama, S. **Control of an outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a haemato-oncology unit.** Journal of Hospital Infection, v. 79, n. 1, p. 49-53, 2011.
- Naas, T.; Cuzon, G.; Villegas, M. V.; Lartigue, M. F.; Quinn, J. P.; Nordmann, P. **Genetic structures at the Origin of Acquisition of the β -lactamase *bla*_{KPC} Gene.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 52, n. 4, p. 1257-1263, 2008.
- Neidell, M.J.; Cohen, B.; Furuya, Y.; Hill, J.; Jeon, C.Y.; Glied, S.; Larson, E.L. **Costs of healthcare- and community-associated infections with antimicrobial resistant versus antimicrobial-susceptible organisms.** Clinical infectious diseases, v. 55, p. 807-815, 2012.
- Nordmann, P.; Cuzon, G.; Naas, T. **The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria.** Lancet Infection Disease, v. 9, p. 228-236, 2009.
- Nordmann, P.; Naas, T.; Poirel, L. **Global spread of carbapenemase-producing enterobacteriaceae.** Emerging Infectious Diseases, v. 17, n. 10, p. 1791 – 1798, 2011.
- Ojeniyi, B. **Polyagglutinable *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. A survey.** Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica, v. 46, p. 1–44, 1994.
- Olge, J. W.; Janda, J. M.; Woods, D. E.; Vasil, M. L. **Characterization and use of a DNA probe as an epidemiological marker for *Pseudomonas aeruginosa*.** The Journal of Infectious Diseases, v. 155, p. 119–126, 1987.
- Olive, D. M.; Bean, P. **Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms.** Journal of Clinical Microbiology, v. 37, p. 1661-1669, 1999.
- Oliveira, A. C.; Kovner, A. T.; Silva, R. S. Infecção hospitalar em unidade de tratamento intensivo de um hospital universitário brasileiro. Revista Latino-Americana de Enfermagem [Internet], v. 18, n. 2, p. 8 telas, 2010. [acesso em: maio de 2014], disponível em http://www.scielo.br/pdf/rlae/v18n2/pt_14.pdf.
- Ørskov, I.; Ørskov, F. Serotyping of *Klebsiella pneumoniae*. Methods in Microbiology, v. 14, p. 143-164, 1984.
- Osano, E.; Arakawa, Y.; Wacharotayankun, R.; Ohta, M.; Horii, T.; Ito, H.; Yoshimura, F.; Kato, N. **Molecular characterization of an enterobacterial metallo- β -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance.** Antimicrobial Agents Chemotherapy, v. 38, n. 1, p.71-78, 1994.

- Osório, A. L. A. R. **Polimorfismo genético de *Trypanosoma (Duttonella) vivax* no Pantanal brasileiro e caracterização antigênica e ultraestrutural de suas frações subcelulares.** [Tese]. Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária. Campo Grande: UFMS/Fiocruz, 2002.
- Paul, M.; Shani, V.; Muchtar, E.; Kariv, G.; Robenshtok, E.; Leibovici, L. **Systematic review and meta-analysis of the efficacy of appropriate empiric antibiotic therapy for sepsis.** Antimicrobial Agents Chemotherapy, v. 54, p. 4851–4863, 2010.
- Peleg, A. Y.; Breij, A.; Adams, M. D.; Cerqueira, G. M.; Mocali, S.; Galardini, M.; Nibbering, P. H.; Earl, A. M.; Ward, D. V.; Paterson, D. L.; Seifert, H.; Dijkshoorn L. **The successful of acinetobacter species, genetic, metabolic and virulence attributes.** PLoS ONE, v. 7, n. 10, p. e46984, 2012.
- Peleg, A. Y.; Seifert, H.; Paterson, D. L. **Acinetobacter baumannii: emergence of a successful pathogen.** Clinical Microbiology Reviews, v. 21, n. 3, p. 538-582, 2008.
- Pfaller, M. A.; Acar, J.; Jones, R. N.; Verhoeff, J.; Turnidge, J.; Sader, H. S. **Integration of molecular characterization of microorganisms in a global antimicrobial resistance surveillance program.** Clinical Infectious Disease, v. 32, s. 2, p. 156-167, 2001.
- Pfeifer, Y.; Cullik, A.; Witte, W. **Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gramnegative bacterial pathogens.** International Journal of Medical Microbiology, v. 300, P. 371-379, 2010.
- Picão, R. C.; Poirel, L.; Gales, A. C.; Nordmann, P. **Further identification of CTX-M-2 extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 53, p. 2225–2226, 2009.
- Pinna, A. U. D.; Sechi, L. A.; Zanetti, S. A. L.; Kalliamurthy, J. **Genetic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with post-operative endophthalmitis.** Acta Ophthalmologica, v. 86, s 243, 2008.
- Pitt, T. L.; Simpson, A. J. ***Pseudomonas* and *Burkholderia* spp.** In: Principles and Practice of Clinical Bacteriology. Second Edition. (Eds. SH Gillespie, PM Hawkey). John Wiley & Sons, London, p.427-443, 2006.
- Podschun, R.; Ullmann, U. ***Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors.** Clinical Microbiology Reviews, v. 11, n. 4, p. 589-603, 1998.
- Poirel, L.; Pitout, J. D.; Nordmann, P. **Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences.** Future Microbiology. v, 2, p. 501–512, 2007.

- Pongas, G.; Hamilos, G.; Rolston, K.V.; Kontoyiannis, D.P. **Formal adult infectious disease specialist consultations in the outpatient setting at a comprehensive cancer center (1998–2008): Diverse and impactful.** Supportive Care in Cancer. v, 20, p. 261–265, 2012.
- Pollini, S.; Maradei, S.; Pecile, P.; Olivo, G.; Luzzaro, F.; Docquier, J.D.; Rossolini, G.M. **FIM-1, a new acquired metallo-beta-lactamase from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Italy.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 57, p. 410-416, 2013.
- Queenan, A. M.; Bush, K. **Carbapenemases: the versatile β -lactamases.** Clinical Microbiology Reviews. v, 20, n. 3, p. 440–458, 2007.
- Quiles, M.G.; Menezes, L.C.; Bauab, K.C.; Gimpl, E.K.; Rocchetti, T.T.; Palomo, F.S.; Carlesse F.; Pignatari, A.C.C. **Diagnosis of bacteremia in pediatric oncologic patients by in-house real-time PCR.** BMC Infectious Diseases, v.15, p. 1-8, 2015.
- Quilty, S.; Kwok, G.; Hajkowicz, K.; Currie B. **High incidence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* sepsis and death in patients with febrile neutropenia at Royal Darwin Hospital.** Internal Medicine Journal, v. 39, n. 8, p. 557 – 559, 2009.
- Quinones-Falconi F, Galicia-Velasco M, Marchiaro P, Mussi MA, Ballerini V, Vila AJ, Viale AM, Bermejo-Morales K, Limansky AS. **Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing metallo- β -lactamases of the IMP-15 and VIM-2 types in Mexico.** Clinical Microbiology and Infection, v. 16, p. 126-131, 2010.
- Ram, R.; Farbman, L.; Leibovici, L.; Raanani, P.; Yeshurun, M.; Vidal, L.; Gafter-GVILI, A.; Peck, A.; Shpilberg, O.; Paul, M. **Characteristics of initial compared with subsequent bacterial infections among hospitalised haemato-oncological patients.** International Journal of Antimicrobial Agents,, v. 40, p.123– 126, 2012.
- Rice, L. B.; Carias, L. L.; Hutton, R. A.; Rudin, S. D.; Endimiani, A.; Bonomo, R. A. **The KQ element, a complex genetic region conferring transferable resistance to carbapenems, aminoglycosides and fluorquinolones in *Klebsiella pneumoniae*.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 52, p. 3427-3429, 2008.
- Robledo, I.E.; Aquino, E.E.; Santé, M.I.; Santana, J.L.; Otero, D.M.; León, C.F.; Vázquez, G.J. **Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 54, n. 3, p. 1354–1357, 2010.

- Roche, C.; Cotter, M. O.; Connell, N.; Crowley, B. **First identification of class A carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in the Republic of Ireland.** Eurosurveillance. v, 14, n, 13, p. 1-2, 2009.
- Rosenblueth, M.; Martínez, L.; Silva, J.; Martínez-Romero, E. ***Klebsiella variicola*, a novel species with clinical and plant-associated isolates.** Systematic and applied microbiology, v. 27, n. 1, p. 27-35, 2004.
- Sabath, L.D.; Abraham, E.P. **Zinc as a cofactor for cephalosporinase from *Bacillus cereus* 569.** Biochemical Journal, v. 98, p. 11c-13c, 1966.
- Sader, H. S.; Hollis, R. J.; Pfaller, M. A. **The use of molecular techniques in the epidemiology and control of infectious diseases.** Clinics in Laboratory Medicine, v. 15, n. 2, p. 407-31, 1995.
- Salabi, A. E.; Toleman, M. A.; Weeks, J.; Bruderer, T.; Frei, R.; Walsh, T. R. **First report of the metallo- β -lactamase SPM-1 in Europe.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 54, p. 582, 2010.
- Saladin, M.; Cao, v.T.; Lambert, T.; Donay, J.L.; Herrmann, J.L.; Ould-Hocine, Z.; Verdet, C.; Delisle, F.; Philippon, A.; Arlet, G. **Diversity of CTX-M β -lactamases and their promoter regions from *Enterobacteriaceae* isolated in three Parisian hospitals.** FEMS Microbiology Letters. v, 209, p. 161-168, 2002.
- Santolaya, M.E.; Alvarez, A.M.; Becker, A.; Cofré, J.; Enríquez, N.; O’Ryan, M.; Payá, E.; Pilorget, J.; Salgado, C.; Tordecilla, J.; Varas, M.; Villarroel, M.; Viviani, T.; Zubieta, M. **Prospective, Multicenter Evaluation of Risk Factors Associated With Invasive Bacterial Infection in Children With Cancer, Neutropenia, and Fever.** Journal of Clinical Oncology. v, 19, n, 14, p. 3415-3421, 2001.
- Satlin, M.J.; Calfee, D.P.; Chen, L.; Fauntleroy, K.A.; Wilson, S.J.; Jenkins, S.G.; Feldman, E.J.; Roboz, G.J.; Shore, T.B.; Helfgott, D.C.; Soave, R.; Kreiswirth, B.N.; Walsh, T.J. **Emergence of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* as causes of bloodstream infections in patients with hematologic malignancies.** Leukemia & Lymphoma, v. 54, n. 4, p.799 – 806, 2013.
- Shahcheraghi, F.; Abbasalipour, M.; Feizabadi, M.; Ebrahimipour, G.; Akbari, N. **Isolation and genetic characterization of metallo- β -lactamase and carbapenemase producing strains of *Acinetobacter baumannii* from patients at Tehran hospitals.** Iranian Journal of Microbiology, v. 3, p. 68-74, 2011.

- Silbert, S.; Boyken, L.; Hollis, R. J.; Pfaller, M. A. **Improving typeability of multiple bacterial species using pulsed-field gel electrophoresis and thiourea.** Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, v. 47, n. 4, p. 619-21, 2003.
- Silveira, M.; Albano, R.; Asensi, M.; Assef, A.P.C. **The draft genome sequence of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain CCBH4851, a nosocomial isolate belonging to clone SP (ST277) that is prevalent in Brazil.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 109, n. 8, p. 1086-1087, 2014.
- Sirot, J.; Labia, R.; Thabaut, A. ***Klebsiella pneumoniae* strains more resistant to ceftazidime than to other third-generation cephalosporins.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 20, n.4, p.611-2, 1987.
- Spacov, I. C. G.; Silva, S. A. M.; Morais Júnior, M. A.; Morais, M. M. C. **Polymorphism of the rDNA and tDNA loci in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: A perspective for molecular epidemiology surveillance.** Genetics and Molecular Biology, v. 29, n. 4, p. 722-729, 2006.
- Speert, D. P. **Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*.** Frontiers in Bioscience, v. 1, n. 7, p. 354-361, 2002.
- Strateva, T.; D. Yordanov. ***Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance.** Journal of Medical Microbiology, v. 58, p. 1133-1148, 2009.
- Strelkauskas, A.J.; Strelkauskas, J.E.; Moszyk-Strelkauskas D. **Antibiotic Resistance.** In: Microbiology: A Clinical Approach. Garland Science: New York, NY, USA, 2010. Disponível em: < http://microsite.garlandscience.com/textbooks/0815365144/site/content/lecture_notes/chapter_20.pdf>. Acesso em: 12 mar, 2013.
- Syrmis, M. W.; O'Carroll, M. R; Sloots, T. P; Coulter, C.; Wainwright, C. E.; Bell, S. C.; Nissen, M. D. **Rapid genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* isolates harboured by adult and paediatric patients with cystic fibrosis using repetitive-element-based PCR assays.** Journal of Medical Microbiology, v. 53, p. 1089–1096, 2004.
- Tang, Y.; Liao, C.; Xu, X.; Song, H.; Shi, S.; Yang, S. **Th1/Th2 Cytokine Profiles in G+/G– Bacteriemia in Pediatric Hematology/Oncology Patients.** Pediatric Blood & Cancer, v. 58, p. 50–54, 2012.
- Tenover, F.C.; Arbeit, R.D.; Goering, R.V.; Mickelsen, P.A.; Murray, B.E.; Persing, D.H.; Swaminathan, B. **Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing.** Journal of Clinical Microbiology, v. 33, p.2233-2239, 1995.

- Todar, K. **The Good, the bad, and the Deadly**. SCIENCE Magazine. University of Wisconsin – Madison, Departament of Bacteriology, v. 304: p. 1421, 2004.
- Toleman, M. A.; Simm, A. M.; Murphy, T. A.; Gales, A. C.; Biedenbach, D. J.; Jones, R. N.; Walsh, T. R. **Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program**. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 50, n. 5, p. 673-9, 2002.
- Towner, K. J.; Lvi, K.; Vlassiadi, M. **Genetic diversity of carbapenem-resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* in Europe**. Clinical Microbiology and Infection v. 14, p.161 – 167. 2008
- Urban, C.; Bradford, P. A.; Tuckman, M.; Segal-Maurer, S.; Wehbeh, W.; Grenner, L.; Colon-Urban, R.; Mariano, N.; Rahal, J. J. **Carbapenem-resistant *Escherichia coli* harboring *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase beta-lactamases associated with long-term care facilities**. Clinical Infectious Diseases, v. 46, p. 127–130, 2008.
- Vasudevan, A.; Memon, B.I.; Mukhopadhyay, A.; Li, J.; Tambyah, P.A. **The costs of nosocomial resistant Gram-negative intensive care unit infections among patients with the systemic inflammatory response syndrome- a propensity matched case control study**. Antimicrobial Resistance and Infection Control. v, 2, p. 1-8, 2015.
- Villegas, M. V.; Lolans, K.; Correa, A.; Kattan, J. N.; Lopez, J. A.; Quinn, J. P.; The Colombian Nosocomial Resistance Study Group. **First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase**. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 51, p. 1553–1555, 2007.
- Wachino, J.; Yoshida, H.; Yamane, K.; Suzuki, S.; Matsui, M.; Yamagishi, T.; Tsutsui, A.; Konda, T.; Shibayama, K.; Arakawa, Y. **SMB-1, a novel subclass B3 metallo-beta-lactamase, associated with ISCR1 and a class 1 integron, from a carbapenem-resistant *Serratia marcescens* clinical isolate**. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 55, p. 5143-5149, 2011.
- Walsh, T. R.; Toleman. M. A.; Poirel, L.; Nordmann, P. **Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm?** Clinical Microbiology Reviews, v.18, n.2, p.306-325, 2005.
- Walther-Rasmussen, J.; Høiby, N. **Class A carbapenemases**. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 60, p. 470–482, 2007.

- Wang, H.; Guo, P.; Sun, H.; Wang, H.; Yang, Q.; Chen, M.; Xu, Y.; Zhus Y. **Molecular epidemiology of clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. from Chinese hospitals.** Antimicrobial Agents Chemotherapy, v. 51, n. 11, p. 4022-4028, 2007.
- Wang, S.S.; Lee, N.Y.; Hsueh, P.R.; Huang, W.H.; Tsui, K.C.; Lee, H.C.; Wu, C.J.; Chang, C.M.; Huang, C.C.; Huang, C.C.; Ko, W.C. **Clinical manifestations and prognostic factors in cancer patients with bacteriemia due to extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* or *Klebsiella pneumoniae*.** Journal of Microbiology, Immunology and Infection, v. 44, p. 282-288, 2011.
- Watanabe, M.; Iyobe, S.; Inoue, M.; Mitsuhashi, S. **Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*.** Antimicrobial Agents Chemotherapy, v.35, n.1, p.147-151, 1991.
- Winn, J.R.; W.C.; Allen, S.D.; Janda, W.M.; Koneman, E.; Procop. G.; Schreckenberger, P.C.; Woods, G. **Koneman Diagnostico Microbiológico**, Texto e Atlas Colorido. 6ª ed. Guanabara Koogan, Brasil, pp 208-386, 2008.
- Woodford, N.; Ellington, M. J.; Coelho, J. M.; Turton J. F.; Ward, M. E.; Brown, S.; Amyes, S. G. B.; Livermore, D. M. **Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp.** International Journal of Antimicrobial Agents, v. 27, p. 351-353, 2006.
- Woodford, N.; Zhang, J.; Kaufmann, M.E.; Yarde, S.; Tomas, M.D.M.; Faris, C.; Vardhan, M.S.; Dawson, S.; Cotterill, S.L.; Livermore, D.M. **Detection of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing VEB-type extended-spectrum beta-lactamases in the United Kingdom.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 62, p. 1265–1268. 2008.
- Yamasaki, S.; Heike, Y.; Mori, S.; Fukuda, T.; Maruyama, D.; Kato, R.; Usui, E.; Koido, K.; Kim, S.; Tanosaki, R.; Tobinai, K.; Teshima, T.; Takaue, Y. **Infectious complications in chronic graft-versus-host disease: a retrospective study of 145 recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with reduced- and conventional-intensity conditioning regimens.** Transplant Infectious Disease. v, 10, n. 4, p 252-259, 2008.
- Yigit, H.; Queenan, A.M.; Anderson, G.J.; Domenech-Sanchez, A.; Biddle, J.W.; Steward, C.D.; Alberti, S.; Bush, K.; Tenover, F.C. **Novel Carbapenem-Hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 45, p. 1151-1161, 2001.

- Zafer, M.M.; Al-Agamy, M.H.; El-Mahallawy, H.A.; Amin, M.A.; Ashour, A.S.E.D. **Antimicrobial Resistance Pattern and Their Beta-Lactamase Encoding Genes among Pseudomonas aeruginosa Strains Isolated from Cancer Patients.** BioMed Research International. v, 2014, 8 pages, 2014.
- Zhang, R.; Yang, L.; Cai, J. C.; Zhou, H. W.; Chen, G. X. **High-level carbapenem resistance in a Citrobacter freundii clinical isolate is due to a combination of KPC-2 production and decreased porin expression.** Journal of Medical Microbiology, v. 57, p.332–337, 2008.
- Zembower, T.R. **Epidemiology of infections in cancer patients.** Cancer Treatment and Research, v. 04, p. 161:43-89, 2014.

APÊNDICE A

FORMULÁRIO DA PESQUISA

Informações Colhidas em Prontuário Clínico

Nº do formulário:

Diagnóstico Bacteriológico: _____ Grupo: _____

Dados Gerais do Paciente	
Nome: _____	
Idade: _____	Sexo: () 1. Masculino () 2. Feminino
Dados de Hospitalização	
Tipo de neoplasia sólida: _____	
Definido como: tipo de câncer primário, informado no prontuário clínico	
Metástase: () 1. Sim () 2. Não Se sim, qual: _____	
Transferência de outro hospital: () 1. Sim () 2. Não Se sim, qual: _____	
Tempo de internamento até diagnóstico da infecção por <i>P. aeruginosa</i> , <i>Klebsiella</i> spp. ou <i>Acinetobacter</i> spp.: _____	
Definido como: Intervalo de tempo em dias, transcorridos desde a admissão no hospital até o surgimento da infecção (Variável discreta)	
Uso de corticoide antes do isolamento do patógeno: () 1. Sim () 2. Não	
Se sim, período de duração do tratamento em dias: _____ (Variável discreta)	
Uso de antimicrobianos nos últimos 3 meses antes do atual internamento: () 1. Sim () 2. Não	
Se sim, qual o nome do antimicrobiano utilizado? _____	
Uso de antimicrobianos durante o atual internamento: () 1. Sim () 2. Não	
Se sim, qual o nome do antimicrobiano utilizado? _____	
Uso de antimicrobianos após o isolamento do patógeno: () 1. Sim () 2. Não	
Se sim, qual o nome do antimicrobiano utilizado? _____	
Evolução clínica: () 1. Alta hospitalar () 2. Óbito () 3. Permaneceu internado	
Óbito relacionado ao quadro infeccioso atual: () 1. Sim () 2. Não () 3. Não se aplica	

Aplicação de Procedimentos Invasivos
Fonte: Prontuário clínico
Ventilação mecânica: () 1. Sim () 2. Não
Acesso venoso central: () 1. Sim () 2. Não
Acesso venoso periférico: () 1. Sim () 2. Não
Sonda vesical de demora: () 1. Sim () 2. Não
Tratamento Cirúrgico: () 1. Sim () 2. Não
Dados relacionados à Infecção
Fonte: Prontuário Clínico
Sítio de infecção: () 1. Pulmão () 2. Corrente Sanguínea () 3. Sítio Urinário () 4. Sítio Cirúrgico () 5. Pele/Tecidos Moles () 6. Abdômen () 7. Outros: _____
Tipo de amostra: () 1. Aspirado Traqueal () 2. Sangue () 3. Urina () 4. Urina () 5. Ponta de cateter venoso central () 7. Outros: _____

Dados da Pesquisa Laboratorial

Metallo-β-lactamases
<i>bla</i> _{IMP-1} : () 1. Positivo () 2. Negativo
<i>bla</i> _{VIM-1} : () 1. Positivo () 2. Negativo
<i>bla</i> _{SPM-1} : () 1. Positivo () 2. Negativo
Outras -β-lactamases
<i>bla</i> _{KPC} : () 1. Positivo () 2. Negativo
<i>bla</i> _{TEM} : () 1. Positivo () 2. Negativo
<i>bla</i> _{CTX-M} : () 1. Positivo () 2. Negativo

APÊNDICE B

Title: **First report of *bla*_{SPM-1} in *Acinetobacter baumannii* in Brazil**

Running title: ***Acinetobacter baumannii bla*_{SPM-1} positive**

Autors:

(1) Paula Regina Luna de Araújo Jácome

Master's degree in Tropical Medicine

Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Medicina Tropical – Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

Address: Av. Moraes Rego 1235 – Cidade Universitária, Recife-PE / Brasil, 50670-901

Tel.: +55 81 21268526 / Fax: +55 81 21268528

e-mail: paulajacome@ibest.com.br

(2) Lílian Rodrigues Alves

Master's degree in Tropical Medicine

Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Medicina Tropical – Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

Address: Av. Moraes Rego 1235 – Cidade Universitária, Recife-PE / Brasil, 50670-901

e-mail: lilianalves88@hotmail.com

(3) Agenor Tavares Jácome Júnior (Jácome Júnior, AT)

PhD in Chemistry

Faculdade ASCES – Laboratório de Microbiologia, Bromatologia e Análise de Água

Address: Av. Portugal, 584 – Bairro Universitário, Caruaru-PE / Brasil, 55016-400

e-mail: agenorjacome@yahoo.com.br

(4) Maria Jesuíta Bezerra da Silva

Expertise in Microbiology

Centro Integrado de Análises Clínicas - Pernambuco, Brazil

Address: Avenida Norte Miguel Arraes de Alencar, 2535 – Encruzilhada, Recife – PE / Brasil, 52041-080

e-mail: zuitabezerra@hotmail.com

(5) Paulo Sérgio Ramos Araújo

PhD in Tropical Medicine

Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Medicina Tropical – Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

Address: Av. Moraes Rego 1235 – Cidade Universitária, Recife-PE / Brasil, 50670-901

Tel.: +55 81 21268526 / Fax: +55 81 21268528

And Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) - Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães - Pernambuco, Brazil

Address: Av. Moraes Rego, s/n – Cidade Universitária – Recife-PE / Brasil, 50670-420

e-mail: psergiora@gmail.com

(6) Ana Catarina S. Lopes

PhD in Biological Sciences

Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Medicina Tropical – Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

Address: Av. Moraes Rego 1235 – Cidade Universitária, Recife-PE / Brasil, 50670-901

e-mail: ana.lopes.ufpe@gmail.com

(7) Maria Amélia Vieira Maciel

PhD in Public Health

Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Medicina Tropical – Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

Address: Av. Moraes Rego 1235 – Cidade Universitária, Recife-PE / Brasil, 50670-901

e-mail: amelia57@gmail.com

ABSTRACT

This is a case report of the first *Acinetobacter baumannii* carrying the bla_{SPM-1} encoding gene, isolated in Brazil, from a patient with a malignant solid tumor. β -lactamase genes were

investigated in bacteria. As carbapenems are the drugs of choice for treating multi-drug resistant isolates, the identification of the *bla*_{SPM-1} gene in *A. baumannii* is worrying for reducing the therapeutic options, making it difficult to face intervention to this pathogen.

Keyword: *Acinetobacter baumannii*, metallo- β -lactamase, Brazil.

In recent decades, multi-drug-resistant (MDR) *Acinetobacter baumannii* has been linked to a wide range of infections related to health care, despite its low virulence. Because of that, it has been regarded as an emerging pathogen that is responsible for infections contracted in hospitals and the community, and this raises difficult questions with regard to its treatment (1). Despite the low frequency in *A. baumannii*, metallo- β -lactamase (MBL) is an important resistance mechanism. It is generally associated with MDR pathogens and confers resistance to most β -lactams, owing to their potent carbapenemase activity and resistance to clinical β -lactamase inhibitors (clavulanate and sulphones) (2).

PATIENT AND METHODS

This is the first SPM-1 detection on *A. baumannii* in Brazil, isolated on January 2014. The strain was isolated from the tracheal secretion sample of a patient, being treated for Stage III breast cancer, who was admitted to the critical care unit (CCU) of a hospital in Recife, Pernambuco, Brazil. After species identification, was analyzed the antimicrobial susceptibility profile as the determination of the minimum inhibitory concentrations (MICs) using an automated system (Vitek2 system; bioMérieux, Hazelwood, MO, USA), and interpreted in accordance with CLSI Guidelines (2014) (3). The *Acinetobacter* species was identified with the Vitek2 system, and confirmed by PCR (Polymerase chain reaction) for *bla*_{OXA-51}-like gene (4).

The following genes were tested using specific primers: *bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{TEM} and *bla*_{GES} (5; 6) and positive control strains were used: *bla*_{SPM-1} (*P. aeruginosa* PSA319), *bla*_{IMP} (*P. aeruginosa* 48-1997A) and *bla*_{VIM} (*P. aeruginosa* VIM-1) supplied by Laboratório Alerta, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP); *bla*_{KPC} (*P. aeruginosa* P22A), *bla*_{CTX-MA} (*Enterobacter cloacae* Ec1A), *bla*_{TEM} (*P. aeruginosa* P14HC) and *bla*_{GES} (*K. pneumoniae* P118HC), from the culture collection of the Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular, Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

RESULTS

The susceptibility test by minimum inhibitory concentrations showed that the isolate exhibited MDR phenotype (Table 1). The *A. baumannii* was resistant to penicillins (ampicillin, amoxicillin–sulbactam, piperacillin-tazobactam), cephalosporins (ceftazidime, ceftriaxone, cefepime), carbapenems (imipenem and meropenem) and quinolones (ciprofloxacin). However, it was found to be sensitive to aminoglycosides (gentamicin and amikacin), glycylicyclines (tigecycline) and polymyxin (colistin).

It is noteworthy that in the previous month of the *Acinetobacter* isolation, the patient had another episode of infection that was underwent sequential therapy with piperacillin-tazobactam, and associated meropenem, amikacin and teicoplanin. However, the patient died the day after the isolation of *A. baumannii* described in this report. The underlying cause of death was a septic shock from the pulmonary site.

Only the *bla*_{SPM-1} gene was amplified. The amplicon was sequenced and the sequence of the encoded protein was determined using BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and ClustalW (<http://www.cbi.ac.uk/>). These analyses confirmed that the amplified gene was *bla*_{SPM-1} (GenBank accession numbers KR185964).

DISCUSSION

This finding suggests interspecies transmission because in Brazil, this gene has only been found in *P. aeruginosa* (7). Interestingly, despite being linked to resistance in *P. aeruginosa* and the fact that its dissemination is almost entirely restricted to Brazil, bla_{SPM-1} has been detected in isolates of *A. baumannii* in Iran (8), India (9), and Saudi Arabia (10). Of these, only the study performed in Iran was conducting sequencing of amplicon and assigned to the GenBank, besides being the only country, among this, with case of bla_{SPM-1} in *P. aeruginosa* published (11). Owing to the severity of the outbreaks of MDR strains and appearance of resistance genes in *Acinetobacter* spp. in hospitals worldwide, we emphasize the importance of continuous monitoring of MDR bacteria in hospitals. Moreover, there is need to adopt measures that can provide a more effective control to minimize the spread of these pathogens, such as a strict adherence to healthcare protocols and environmental decontamination.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank the staff at the microbiology sector - Centro Integrado de Análises Clínicas (CIAC), for their assistance in isolating and classifying clinical samples; and the staff of the Infection Control Practices Advisory Committee (ICPAC), for their help in collecting the clinical and therapeutic data from the patient. This work was financially supported by a grant from the Conselho Nacional Científico e Tecnológico (CNPq) to MAVM (process #474777/2013-8).

References

1. Kempf M, Rolain J M. Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. *Int J Antimicrob Agents* 2014; **39**:105-14.
2. Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams? *Lancet Infect Dis* 2011; **11**:381-93.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility. Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. CLSI document M100-S24. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. **2014**.
4. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM *et al*. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Ag* 2006; **27**:351-3.
5. Cabral AB, Melo RCA, Maciel MAV, Lopes ACS. Multidrug resistance genes, including blaKPC and blaCTX-M-2, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil. *Rev Soc Bras Med Tro* 2012; **45**:572-8.
6. Wang C, Cai P, Chang D *et al*. A *Pseudomonas aeruginosa* isolate producing the GES-5 extended-spectrum β -lactamase. *J Antimicrob Chemoth* 2006; **57**:1261-2.
7. González LJ, Moreno DM, Bonomo RA, Vila1 AJ. Host-specific enzyme-substrate interactions in SPM-1 metallo- β -Lactamase are modulated by second sphere residues. *PLoS Pathog* 2014; **10**: e1003817.
8. Shahcheraghi F, Abbasalipour M, Feizabadi M *et al*. Isolation and genetic characterization of metallo- β -lactamase and carbapenamase producing strains of *Acinetobacter baumannii* from patients at Tehran hospitals. *Iran J Microbiol* 2011; **3**:68-74.

9. Azim A, Dwivedi M, Rao PB *et al.* Epidemiology of bacterial colonization at intensive care unit admission with emphasis on extended-spectrum β -lactamase- and metallo- β -lactamase-producing Gram-negative bacteria—an Indian experience. *J Med Microbiol* 2010; **59**:955-60.
10. Al-Sultan AA. Diabetic patients are threatened by “superbugs” *Acinetobacter baumannii* In Saudi Arabia. *Int J Infect Dis* 21:351. *In* 16th International Congress on Infectious Diseases (ICID), Local Organizing Committee and Federation of Infectious Diseases Societies of Southern Africa (FIDSSA), Cape Town, South Africa. **2014**.
11. Ghamgosha M, Zahedani SS, Kafilzadeh F *et al.* Metallo- β -lactamase genes VIM-1, SPM-1 and IMP-1 in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Zahedan Hospitals. *Int J Infect* 2014; **1**:e19635.

Table 1. Minimum inhibitory concentrations (MIC) against *Acinetobacter baumannii* bla_{SPM-1} gene carrier.

Antibiotic	MIC (mg/mL)
Ampicillin	≥ 32
Amoxicillin–sulbactam	16
Piperacillin-tazobactam	≥ 128
Ceftazidime	≥ 64
Ceftriaxone	≥ 64
Cefepime	32
Imipenem	≥ 16
Meropenem	≥ 16
Amikacin	≤ 2
Gentamicin	≤ 1
Ciprofloxacin	≥ 4
Tigecycline	1
Colistin	≤ 0,5

De AJIC American Journal of Infection Control 

Remetente ees.ajic.0.349a92.47f08606@eesmail.elsevier.com 

Para paulajacome@ibest.com.br , paulajacome83@gmail.com 

Assunto Submission Confirmation

14/10/2015 11:06

Dear Mrs. Paula Regina Luna de Araújo Jácome,

Your submission entitled "First report of blaSPM-1 in *Acinetobacter baumannii* in Brazil" has been received by American Journal of Infection Control

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/ajic/>. Your username is: paulajacome@ibest.com.br
If you need to retrieve password details, please go to:
http://ees.elsevier.com/ajic/automail_query.asp

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to the American Journal of Infection Control.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
American Journal of Infection Control

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

APÊNDICE C

Title: **Detection of *bla*_{SPM-1}, *bla*_{KPC}, *bla*_{TEM} and *bla*_{CTX-M} genes in isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. and *Klebsiella* spp. from cancer patients with healthcare associated infections**

Running title: **Detection of β -lactamase in isolates from cancer patients**

Autors:

(1) Paula Regina Luna de Araújo Jácome (Corresponding author)

Master's degree in Tropical Medicine

Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Medicina Tropical – Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

Address: Av. Moraes Rego 1235 – Cidade Universitária, Recife-PE / Brasil, 50670-901

Tel.: +55 81 21268526 / Fax: +55 81 21268528

e-mail: paulajacome@ibest.com.br

(2) Lílían Rodrigues Alves

Master's degree in Tropical Medicine

e-mail: lilianalves88@hotmail.com

(3) Agenor Tavares Jácome Júnior (Jácome Júnior, AT)

PhD in Chemistry

e-mail: agenorjacome@yahoo.com.br

(4) Maria Jesuíta Bezerra da Silva

Expertise in Microbiology

e-mail: zuitabezerra@hotmail.com

(5) Jailton Lobo da Costa Lima

Degree in Biomedicine

Address: Av. Moraes Rego 1235 – Cidade Universitária, Recife-PE / Brasil, 50670-901

e-mail: jailtonlobo@hotmail.com

(6) Paulo Sérgio Ramos Araújo

PhD in Tropical Medicine

e-mail: psergiora@gmail.com

(7) Ana Catarina S. Lopes

PhD in Biological Sciences

e-mail: ana.lopes.ufpe@gmail.com

(8) Maria Amélia Vieira Maciel

PhD in Public Health

e-mail: amelia57@gmail.com

GenBank accession number: KR185964

Abstract

Pseudomonas aeruginosa, *Acinetobacter* spp. and *Klebsiella* spp. are three of the pathogens most frequently involved in cancer patients infections, and the production of β -lactamases is a major mechanism of resistance due to its wide diversity of existing enzymes. Therefore, the aim of the present study was to investigate the microbiological profile and data related to patients and infections, and search for the *bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{TEM} and *bla*_{CTX-M} genes in bacterial isolates from hospitalized cancer patients in a hospital in Recife, in Pernambuco/Brazil. A total of 169 isolates were recovered between 2012 and 2014, of which 58 were *P. aeruginosa*, 36 were *Acinetobacter* spp. and 75 were *Klebsiella* spp.. A high percentage of carbapenem resistance was observed in *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* spp.. In contrast, the lowest resistance percentage in the three groups of bacteria was for aminoglycoside. Among the carbapenem-resistant bacteria, the *bla*_{SPM-1} gene was detected in *P. aeruginosa* (35.5%) and *Acinetobacter* spp. (3.8%), while *bla*_{KPC} was detected in *P. aeruginosa* (25.8%) only. Among the third and fourth generation cephalosporin resistant strains, the *bla*_{TEM} gene was detected in *Acinetobacter* spp. (25.9%) and *Klebsiella* spp. (30.6%), and the *bla*_{CTX-M} gene in 58.3% of *Klebsiella* spp.. This the first report of *Acinetobacter baumannii* *bla*_{SPM-1} gene carrier that has been isolated in Brazil. These results therefore provide knowledge of susceptibility profile and resistance mechanisms and thus can contribute to the strategic formulation of hospital infection control plans and the rational use of antimicrobials, reducing mortality from infection levels in cancer patients.

Keywords: β -lactamases, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *Klebsiella* spp., Cancer.

Introduction

Bacterial infections have also been indicated as a significant cause of mortality and morbidity among cancer patients suffering or not from neutropenia, despite advances in antibiotic therapy in recent decades (Wang et al., 2011; Pongas et al., 2012). The frequency and severity of infections may be related to the use of potent cytotoxic drugs and increasingly invasive diagnostic tools (Maschmeyer & Haas 2008; Wang et al., 2011).

In view of this vulnerability among patients with cancer, this population is more susceptible to community and healthcare associated infections (HAI). According to a new survey by the Centers for Disease Control and Prevention (CDC), one in 25 hospitalized patients (4.0%; 95% confidence interval, 3.7 to 4.4) is battling an HAI,

defined as, those infections acquired in hospital or healthcare service unit that first appear 48 h or more after hospital admission or within 30 days after discharge following in patient care (Revelas, 2012, Magill et al., 2014). Another cause for concern in many healthcare centers for patients with cancer, are the high bacterial resistance rates and the rise of opportunistic multidrug-resistant (MDR) pathogens such as *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* (Pongas et al., 2012; Fukuta et al., 2013; Marín et al., 2014).

Gram positive bacteria was described as the most frequent cause of HAI in cancer patients, especially through bloodstream infection (BSI) (Wisplinghoff et al., 2003; Maschmeyer & Haas 2008; Wang et al., 2011; Kosmidis & Chandrasekar 2012), however, in recent years a change in the epidemiology of infections in this group of patients has been observed, with an increase in infections caused by Gram negative bacteria, and increasing antibiotic resistance due to the overuse of antibiotics in this group of patients (Gudiol et al., 2013; Montassier et al., 2013; Bassetti & Righi 2013; Marín et al., 2014). The Gram-negative bacteria most frequently isolated in cancer patients are the Enterobacteriaceae *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp, followed by the glucose non-fermenting bacilli *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. and *Stenotrophomonas maltophilia*.. (Wang et al., 2011; Bassetti; Righi 2013; Marín et al., 2014). In this bacteria group, β -lactamases production has been identified as a major cause of multidrug resistance, because of the wide diversity of enzymes, including Extended-Spectrum β -Lactamases (ESBL) such as TEM, SHV and CTX-M, and carbapenemases such as GES, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) and metallo- β -lactamase (MBL) (Wang et al., 2011; Bassetti & Righi 2013; Chaudhary & Payasi, 2014; Zafer et al., 2014).

Thus, the study of the resistance profile and frequency of isolated β -lactamase producers is important for an understanding of the epidemiology of HAIs and to recommend and adopt appropriate preventive and control measures. Therefore, the present study aimed to investigate the microbiological profile and data related to patients and infections, and search for the *bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{TEM} and *bla*_{CTX-M} genes in bacterial isolates from cancer patients admitted to a hospital located in Recife, in the state of Pernambuco, Brazil, between November 2012 and April 2014.

Materials and Methods

Collection and identification of bacterial isolates

Pseudomonas aeruginosa, *Acinetobacter* spp. and *Klebsiella* spp. were collected from November 2012 to April 2014, from patients with solid cancer, admitted to a hospital specializing in the care of cancer patients located in Recife, Pernambuco, Brazil.

The samples were collected by hospital staff and sent to an outsourced laboratory (Centro Integrado de Análises Clínicas - CIAC) for isolation, identification and antimicrobial susceptibility testing. Species identification was performed using standard microbiological techniques (Winn, et al., 2008) and antimicrobial susceptibility testing was performed by the disk diffusion test and followed Clinical and Laboratory Standards Institute Guidelines (2014) (CLSI, 2014). The strains were then provided for analysis and kept frozen in 20% glycerol at -20°C for subsequent analysis.

Sample characterization

The sample type and site of hospitalization was collected from the results of microbiological tests and the type of solid tumor from medical records.

Extraction and quantification of DNA

The total DNA of strains carbapenems or third and fourth generation cephalosporins resistant was extracted. This was done using DNA extraction kit Brazol (LGC Biotechnology) according to the protocol provided by the manufacturer, and the measurement thereof was performed by spectrophotometry (Ultraspec 3000, Pharmacia Biotech) in a range of wavelength between 260 at 280 nm.

Polymerase chain reaction (PCR) of β -lactamase genes

β -lactamase genes (bla_{TEM} , bla_{CTX-M}) were investigated in third and fourth generation cephalosporin resistant strains and carbapenem resistant strains. MBL genes (bla_{SPM-1} , bla_{IMP} , bla_{VIM}) and bla_{KPC} were investigated using specific primers (Table 1) (Rasheed et al., 2000; Yigit et al., 2001; Saladin et al., 2002; Gales et al., 2003; Dong et al., 2008). These genes were investigated in *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. and *Klebsiella* spp. strains, except the bla_{CTX-M} gene, the study of which was performed only in isolates of *Klebsiella* spp., as it is the most frequent type of gene of the genre.

For each gene the amplification reactions were performed in a total volume of 25 μ L per tube, comprising of the following concentrations.

β -lactamase group TEM, CTX-M and KPC

For the bla_{TEM} and bla_{CTX-M} genes 10 ng of genomic DNA was used, and for the bla_{KPC} gene 5ng of the same was used. A total of 25 pmol of primers (Table 1), 1x buffer, 200 μ M of deoxyribonucleotide triphosphate (Ludwig Biotec), 1.5 mM of $MgCl_2$ and 2.0U of Taq DNA polymerase (Promega) were added (Rasheed et al., 2000; Yigit et al., 2001; Saladin et al. 2002).

Metallo- β -lactamases

For the *bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} genes 25 ng of genomic DNA, 10 pmol of primers (Table 1), 1x buffer, 100µM of deoxyribonucleotide triphosphate (Ludwig Biotec), 1.5 mM of MgCl₂ and the 1.0U Taq DNA polymerase (Promega) were used (Dong et al., 2008, Gales et al., 2003).

PCR amplification was performed in a thermocycler (Biosystems) as follows: initial denaturation at 95 ° C for 5 minutes followed by 30 cycles (*bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}) or 35 cycles (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{KPC}) of denaturation at 95 ° C for 1 minute, annealing according to the temperature described in table 1 for 1 minute, and extension at 72 ° C for 1 minute, and then a final extension of 10 minutes at 72 ° C) (Dong et al., 2008, Gales et al., 2003, Rasheed et al.2000, Saladin et al.2002, Yigit et al.2001).

The PCR products were stained with blue dye (Jena Bioscience) and subjected to electrophoresis on 1.0% agarose gels in a TBE buffer (0.089M Tris-borate EDTA 0.002M) under a constant voltage of 100V, visualized under UV light and photo documented.

For each PCR, a negative control was included, consisting of reaction components and no added template DNA, and positive control strains for the genes: *bla*_{SPM-1} (*P. aeruginosa* PSA319), *bla*_{IMP} (*P. aeruginosa* 48-1997A) and *bla*_{VIM} (*P. aeruginosa* VIM-1) supplied by the Laboratório Alerta, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP); *bla*_{KPC} (*P. aeruginosa* P22A), *bla*_{CTX-MA} (*Enterobacter cloacae* Ec1A) and *bla*_{TEM} (*P. aeruginosa* P14HC), from the culture collection of the Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular, Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Molecular typing

MDR strains, meaning resistant to at least three different classes of antibiotics (CDC, 2013), were submitted to molecular typing through technical Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-based PCR (ERIC-PCR) to identify the clonal profile of the strains. The ERIC-PCR reactions were prepared in a total volume of 25 µL per tube, containing: 100 ng genomic DNA, 10 pmol of the primers (ERIC-1 [5'-ATG TAAGCTCCTGGGGATTCAC-3']; ERIC-2 [5' -AAGTAAGTGAAGTGGGGTGAGCG-3']) (Duan et al. 2009), 1x buffer, 200µM of each deoxyribonucleotide triphosphate (Ludwig Biotec), 1.5mM of MgCl₂ and 1.0U Taq DNA polymerase (Promega). The amplification parameters used were 95°C for 3 minutes, followed by 30 cycles of denaturation at 92°C for 1 minute, annealing at 36°C for 1 minute and extension at 72°C for 8 minutes, followed by a final extension of 16 minutes at 72°C (Duan et al. 2009). PCR products were stained with green dye (Jena Bioscience) and subjected to electrophoresis on agarose gel to 1.5% in a TBE buffer under a constant voltage of 100V. The band patterns generated by ERIC-PCR were analyzed in accordance with Tenover *et al.*, (1995).

Results

Sample characterization

From November 2012 to April 2014, 169 isolates were collected and included in the search criteria, of which 75 were *Klebsiella* spp. (44.4%), 58 were *P. aeruginosa* (34.3%) and 36 were *Acinetobacter* spp. (21.3%). These isolates were obtained from 107 patients with solid cancer, admitted to a hospital specializing in the care of patients with cancer located in Recife, Pernambuco, Brazil.

The most frequent samples were tracheal aspirate (37.9%), blood culture (20.1%) and urine culture (12.4%); and more than half of the patients were admitted to the intensive care unit (ICU) (63.2%), which is a risk factor for infections caused by MDR pathogens (Table 2).

When analyzing the cancer types, grouping together all the clinical isolates of the study, the most frequent were bowel tumor (11.4%), breast cancer (10.5%) and prostate cancer (8.7%), respectively. However, there was little variation in the sequence of presumptive diagnosis in order of magnitude between bacteria. Thus the most common malignancies were breast cancer (13.3%), laryngeal cancer (13.3%) and colon cancer (10.7%) for *P. aeruginosa*, prostate cancer (19.0%), colon cancer (14.3%) and lung cancer (7.1%) for *Acinetobacter* spp., and bowel cancer (10.8%), prostate cancer (9.8%) and stomach cancer (6.9%) for *Klebsiella* spp. (Table 2).

Antimicrobial susceptibility profile

The antimicrobial susceptibility profile showed that *Acinetobacter* spp. had the highest percentage of antimicrobial resistance, while *Klebsiella* spp. presented the highest percentages of antimicrobial susceptibility. A high percentage of carbapenem resistance was also noted in both *P. aeruginosa* (53.4%) and *Acinetobacter* spp. (66.7%). However, in *Klebsiella* spp., carbapenems were the class of antimicrobials with the highest sensitivity percentage, demonstrating that they remain an effective therapeutic option for the bacteria group (Table 3).

In general, the class of antimicrobials whose bacteria had a higher percentage of sensitivity were aminoglycosides, ranging from 55.2% in *P. aeruginosa* to 84.4% in *Klebsiella* spp., when amikacin was used (Table 3).

Analyzing the greatest percentage of bacteria resistance, it was found that 53.4% of *P. aeruginosa* strains were resistant to imipenem and to meropenem. As for the *Acinetobacter* spp. strain, the greatest antimicrobial resistance was detected in ciprofloxacin (77.8%), ceftriaxone (75.0%) and ceftazidime (72.2%); and for the *Klebsiella* spp. strains, in ampicillin (88.3%) and ceftriaxone (51.9%) (Table 3).

Regarding MDR rates, it was found that 58.6% of *P. aeruginosa*, 77.8% of *Acinetobacter* spp. and 64.0% of *Klebsiella* spp. were MDR.

PCR of β -lactamase genes

The research strains of β -lactamase genes were selected from the criteria described in the methodology and the results obtained are shown in Table 4.

The *bla*_{SPM-1} gene was detected in 11 isolates of *P. aeruginosa* (35.5%) and one of *Acinetobacter baumannii* (3.8%), with the latter being the first case of a positivity gene in bacteria of the genus *Acinetobacter* in Brazil. The amplicon was sequenced and the sequence of the encoded protein was determined using BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and ClustalW (<http://www.cbi.ac.uk/>). These analyses confirmed that the amplified gene was *bla*_{SPM-1} (GenBank accession numbers KR185964).

The *bla*_{KPC} gene was also amplified in eight isolates of *P. aeruginosa* (25.8%), of which one strain presented *bla*_{SPM-1} and *bla*_{KPC} genes concomitantly. No isolate was positive for the *bla*_{IMP} and *bla*_{VIM} genes (Table 4).

For the other β -lactamase gene, *bla*_{TEM} was identified in seven isolates of *Acinetobacter* spp. (25.9%) and 11 isolates of *Klebsiella* spp. (30.6%), but was not amplified in *P. aeruginosa* from the hospital. While the *bla*_{CTX-M} gene had the highest molecular frequency in the study, with 21 *Klebsiella* spp. positive strains, which represented 58.3% of the bacteria analyzed for this gene (Table 4). It was also observed that, of 11 *Klebsiella* spp. *bla*_{TEM} positive strains, eight also presented the *bla*_{CTX-M} gene concomitantly.

Molecular typing

Molecular typing was performed only in MDR isolates, totaling 30 *P. aeruginosa*, 30 *Acinetobacter* spp. and 39 *Klebsiella* spp.. Twenty-one different profiles were identified for *P. aeruginosa*, with three of these being considered clonal profiles with a similarity of 100%. The other profiles had similarities ranging from 4% to 40% (Figure 1a).

For *Klebsiella* spp., 35 different profiles were detected, with three clonal profiles and other similarities ranging from 5% to 75% (Figure 1b).

For *Acinetobacter* spp., 17 different profiles were identified, five of which were considered clones, with one predominant clone whose profile was identified in 10 isolates. The other profiles had similarities ranging from 4% to 60% (Figure 1c).

Discussion

Several natural or acquired antimicrobial resistance mechanisms may be related to the failure of infection treatment. Against β -lactams, the most important mechanism is the synthesis of β -lactamase, which exhibits a great diversity of enzymes, with 1600 variants (Jacoby & Bush, Lahey, 2015).

In the present study, 169 clinical isolates of *Acinetobacter* spp., *P. aeruginosa* and *Klebsiella* spp. were obtained from several samples from patients with solid neoplasia, which were tested for the presence of genes responsible for the synthesis of the SPM-1, IMP, VIM, KPC, TEM and CTX-M enzymes. The most frequently occurring bacteria in the study was *Klebsiella* spp. followed by *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* spp..

In a similar study, but performed with patients without cancer, Chaudhary & Payasi (2014), investigated the β -lactamase genes of AmpC, OXA, KPC, BlaZ and ESBL in *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* collected from patients admitted to different hospitals in India. In this study, the rate of *P. aeruginosa* was nearly three times greater than *Klebsiella* spp., whereas in the present study the reverse was observed, with the prevalence of *P. aeruginosa* being about 30% less than *Klebsiella* spp.. In both studies, the proportion of *Acinetobacter* spp. was the lowest among the three bacteria.

Ram *et al.* (2012) analyzed the levels of bacterial infection and antibiotic susceptibility between the initial and subsequent episodes of infection in patients with hematologic cancers from a Hospital in Israel, and found the same order of bacteria frequency as the present study, although the difference between *Klebsiella* spp. and *P. aeruginosa* was only 5%. Although slight variations from the order of incidence of the pathogens, *P. aeruginosa*, *Klebsiella* spp. and *Acinetobacter* spp., were among the top five causes of infection in cancer and non-cancer patients (Pongas *et al.*, 2012; Ram *et al.*, 2012; Chaudhary & Payasi 2014; Andria *et al.*, 2015).

In terms of clinical sample types, tracheal aspirates were the most frequent in the present study, followed by blood and urine. In the Chaudhary & Payasi (2014) study, blood samples were also the second most frequent clinical material, although the most frequent for *A. baumannii* and *Klebsiella* spp. was sputum sample, and the most common for *P. aeruginosa* was pus. Many studies have focused on the association between infection from the blood stream and high morbidity and mortality, either directly or by interfering with the chemotherapy schedule, which makes blood culture examination of important predictive value for infection (Paul *et al.*, 2010; Araujo, 2012; Miedema *et al.*, 2013; Moghnieh *et al.*, 2015).

Regarding cancer types, the results of the present study corroborated the data from the Hospital Information System of the Brazilian Unified National Health System (SIH-SUS), whose analysis of the cancer internment

statistics in the state of Pernambuco (target population) revealed that the most common types of cancer among the patients included in the present study correspond to the same magnitude as cause of hospitalization in the same location and study period (Brasil, 2015).

Concerning microbiological data, antimicrobial susceptibility profile of the samples from the present study demonstrated a percentage of resistance to carbapenems higher than 50% for both *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* spp., and close to 10% for *Klebsiella* spp.. In the general population, recent studies have indicated that the prevalence of gram-negative carbapenem resistant pathogens, particularly *P. aeruginosa*, *A. baumannii* and *Enterobacteriaceae*, has increased dramatically in the last decade (Akova et al. 2012; Lee & Doi, 2014).

Regarding MDR percentage, it was found that 58.6% of *P. aeruginosa*, 77.8% of *Acinetobacter* spp. and 64.0% of *Klebsiella* spp. demonstrated this profile. Much lower percentages were detected in a study by Maríns *et al.* (2014), also conducted with hospitalized patients with solid tumors in a Spanish hospital between January 2006 and July 2012. In this, the frequency of Gram-negative bacilli MDR was 13.4% (43/320), of which five were *P. aeruginosa* (9.6%), one was *A. baumannii* (50.0%), 20 were ESBL producing *Enterobacteriaceae* (7.6%), 13 were AmpC producing *Enterobacteriaceae* (5.0%) and one was *K. oxytoca*, a chromosomal β -lactamase hyper producer (11.1%).

When comparing the frequency of MDR strains of this study with others carried out with non-cancer patients admitted to hospitals in the same city as the present study, similar MDR percentages were found, as in the study by Jácome *et al.* (2012a), which found a percentage of *P. aeruginosa* MDR of 54.1%; Hinrichsen *et al.* (2014), which detected a ratio ranging from 53.0% to 86.0% of *Acinetobacter* spp. MDR, in two different hospitals; and Melo *et al.* (2011), who found an overall percentage of *Klebsiella* spp. MDR of 60.6% among the investigated strains. Therefore, it can see that the frequency of MDR isolates in Recife hospital has remained consistently high in recent years.

Among the carbapenems and ceftazidime resistant strains, the present study found that 35.5% of *P. aeruginosa* exhibited the *bla*_{SPM-1} gene. Considering hospitals located in the same city, Jácome *et al.* (2012a) detected a lower frequency of 20.7% of isolates resistant to carbapenems and ceftazidime and 46.2% when only MBL phenotypically positive strains were considered. While Cavalcanti *et al.* (2012), in another university hospital located in the same city as this study, identified a higher percentage of the *bla*_{SPM-1} gene (83.6%) in the imipenem and ceftazidime resistant *P. aeruginosa* strains investigated.

While in cancer patients, studies performed in a pediatric hospital located in São Paulo, Brazil, there was a detection of *bla*_{SPM-1} gene ranged from 33.3% to 56.3% (Fernandes et al., 2010, Quiles et al., 2015). These results show a persistence of *P. aeruginosa* SPM-1 positive in Brazilian hospitals in general, over the years.

With regard to the identification of the *bla*_{SPM-1} gene in *Acinetobacter* spp., this was the first such case in Brazil. This gene is associated with a single clone (SP/ST 277) of *P. aeruginosa* and while its dissemination is almost totally restricted to Brazil (González et al., 2014), there are a few reports of it in other countries such as Switzerland (Salabi et al., 2010), Mexico (Quinones-Falconi et al., 2010), South Korea (Lee et al., 2012) and Iran (Ghamgosha et al., 2014), all bonded to the *P. aeruginosa* species. In *A. baumannii*, only one case has been described in Iran, from which the gene was sequenced and deposited in GenBank, and proved to be the *bla*_{SPM-1} gene (Shahcheraghi et al., 2011).

Although MBL are not the most prevalent carbapenemases in *Acinetobacter* spp., these enzymes contribute to the high level of resistance to carbapenems (Lin & Lan, 2014). The highest concentration of cases of MBL in *Acinetobacter* species occurs in Asian countries, followed by European nations. The most identified genes in this genus are *bla*_{IMP-1}, *bla*_{VIM-2} and *bla*_{NDM-1}, respectively (Lin & Lan, 2014).

The *bla*_{IMP-type} and *bla*_{VIM-type} genes are rarely found in Brazilian hospitals, and several studies exist in which these genes were not amplified, either in cancer or non-cancer patients (Fernandes et al., 2010, Jácome et al., 2012a, Cavalcanti et al., 2012, Quiles et al., 2015). However, these genes deserve attention since they have been found in some Brazilian states, especially *bla*_{IMP}, which has already been detected in São Paulo (Sader et al., 2005), Rio de Janeiro (Pellegrino et al., 2001), Brasília (Mendes et al., 2004), Joao Pessoa (Santos-Filho et al., 2002), Porto Alegre (Martins et al., 2007) and Santa Catarina (Scheffer et al., 2010). The *bla*_{VIM} gene, meanwhile, has been detected in São Paulo (Sader et al., 2005; Franco et al., 2010).

In the present study, the *bla*_{KPC} gene was amplified only in *P. aeruginosa* (25.8%), however, it is noteworthy that the number of isolates of *Klebsiella* spp. resistant to carbapenems was very low, reinforcing the absence of carbapenemase genes among *Klebsiella* spp. at the studied hospital. Other studies conducted in Recife hospitals, with non-cancer patients, showed a higher frequency of *K. pneumoniae* isolates that were resistant to carbapenems, as well as a strain carrying the *bla*_{KPC} gene (Cabral et al., 2012; Melo et al., 2014).

Despite the *bla*_{KPC} gene being rarely detected in *P. aeruginosa* (Zafer et al., 2014), it is important to note that the first case of identification of *bla*_{KPC} gene in *P. aeruginosa* in Brazil occurred in a public hospital in Recife (Jácome et al., 2012b), the same city as this study. Furthermore, following a global trend, Chaudhary & Payasi (2014) obtained an opposite result from this study in non-cancer patients in India, where the *bla*_{KPC} gene

was not amplified in *P. aeruginosa* and *A. baumannii*, but was amplified in 26.1% of the isolates of *K. pneumoniae* and 17.4% of *K. oxytoca*. Quiles *et al.* (2015), meanwhile, did not detect the *bla_{KPC}* gene in *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. and *Klebsiella* spp. in a blood stream infection sample from pediatric cancer patients.

As for other β -lactamases, the *bla_{TEM}* gene was identified in 25.9% of *Acinetobacter* spp. and 30.6% of *Klebsiella* spp.. Lower percentages were detected in non-cancer patients admitted to a hospital in India, where the *bla_{TEM}* gene was detected in *A. baumannii* (9.6% *bla_{TEM-1}*, 9.6% *bla_{TEM-3}*, 11.5% *bla_{TEM-50}*), *K. pneumoniae* (21.7% *bla_{TEM-1}*, 21.7% *bla_{TEM-3}*), and *K. oxytoca* (21.7% *bla_{TEM-1}*) (Chaudhary & Payasi 2014). In contrast to the present study, where the *bla_{TEM}* gene was not detected in *P. aeruginosa*, and Chaudhary & Payasi (2014) detected *bla_{TEM-1}*, *bla_{TEM-3}* e *bla_{TEM-50}* genes in 14.5%; 14.0% and 6.0% of bacteria of these species, respectively. Also in India, but among non-cancer patients, Chandra & Goswami (2012) detected an incidence of ESBL in 65.7% of *K. pneumoniae* investigated, of which 80% were positive for *bla_{TEM}* genes.

In accordance with a review study that aimed to verify the nosocomial epidemiology of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in Latin America, about 58% of *K. pneumoniae* isolates were ESBL positive in Brazil, and CTX-M are the most prevalent. This rate is higher than in other regions of the world (Gusmán-Blanco *et al.*, 2014).

In the present study, the frequency of the *bla_{CTX-M}* gene from *Klebsiella* spp. was 58.3%, making it the most common gene in the present study, confirming other findings in Latin America, described in literature (Morfin-Otero *et al.*, 2013, Gusmán-Blanco *et al.*, 2014, Nogueira *et al.*, 2015).

It is also interesting to note the identification of multi-drug resistant clones and carriers of β -lactamase genes in different hospital sectors, pointing to the spread risk of these pathogens in the hospital. The application of molecular typing techniques in sample hospitals allows the dynamics of transmission of infections to be mapped, thus leading to a more targeted application of infection control measures at local level (Hafiane & Ravaoarinoro, 2008).

Additionally, joint implementation of effective measures for infection control, microbiological monitoring and surveillance of antimicrobial resistance patterns is of the utmost importance to reducing the morbidity and mortality rates caused by bacterial infections, and lowering hospital costs (Vasudevan *et al.*, 2015). For this purpose, in 2014, a law was established in Germany requiring the issuing of surveillance reports on infectious agents and their antibiotic resistance patterns, as well as on the use of antibiotics in many medical institutions (Warnke *et al.*, 2014).

Therefore, surveillance studies to identify the microbiological profile and antimicrobial susceptibility profile, together with the molecular identification of genetic mechanisms of resistance, are useful to determine the diversity of micro-organisms and resistance genes present in the hospital environment, so guiding appropriate therapy and working towards the implementation of infection control measures, especially for patients more susceptible to HAI. Additionally, in cancer patients, identifying isolate sites and their related malignancies can contribute to direct specific care standards for at risk groups, aimed at minimizing episodes of HAI in these patients.

Acknowledgements

We would like to thank the staff at the microbiology sector - Centro Integrado de Análises Clínicas (CIAC), for their assistance in isolating and classifying clinical samples; and the staff of the Infection Control Practices Advisory Committee (ICPAC), for their help in collecting the clinical and therapeutic data from the patient. This work was financially supported by Conselho Nacional Científico e Tecnológico (CNPq) grant to MAVM (process #474777/2013-8).

Conflict of Interest

We declare that we have no conflict of interest.

Compliance with Ethical Standards

This study was approved by the Human Research Ethics Committees beings of Pernambuco Cancer Hospital (CAAE 05554812.7000.5205).

References

1. Akova, M., Daikos, G.L., Tzouvelekis, L. & Carmeli, Y. (2012). Interventional strategies and current clinical experience with carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology and Infection* 18:439-48.
2. Andria, N., Henig, O., Kotler, O., Domchenko, A., Oren, I., Zuckerman, T., Ofra, Y., Fraser, D. & Paul, M. (2015). Mortality burden related to infection with carbapenem-resistant Gram-negative bacteria among haematological cancer patients: a retrospective cohort study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 70:3146-3153.

3. **Araujo, M.R.E. (2012).** Hemoculturas: recomendações de coleta, processamento e interpretação dos resultados. *Journal of Infection Control* **1**:08-19.
4. **Bassetti, M. & Righi, E. (2013).** Multidrug-resistant bacteria: what is the threat? Hematology. *American Society of Hematology Education Program* **2013**:428-432.
5. **Brasil (2015).** Internações segundo Lista Morbidade CID-10. Capítulo CID-10: II. Neoplasias (tumores). Período: Novembro/2012-Abril/2014. Ministério da Saúde - Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS) [Accessed Jul 2015]. Available from: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/nipe.def>.
6. **Cabral, A.B; Melo, R.C.A., Maciel, M.A.V. & Lopes, A.C.S. (2012).** Multidrug resistance genes, including blaKPC and blaCTX-M-2, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **45**:572-578.
7. **Cavalcanti, F.L.S., Almeida, A.C.S., Vilela, M.A., Morais, M.M.C. & Morais-Junior, M.A. (2012).** Changing the epidemiology of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian teaching hospital: the replacement of São Paulo metallo- β -lactamase-producing isolates. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **107**: 420-423.
8. **CDC. Centers for Disease Control and Prevention (2013).** Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia. [Accessed Feb 2016]. Available from: www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf
9. **Chandra,V. & Goswami, P.N. (2014).** Detection of TEM. & SHV genes in Extended Spectrum Beta Lactamase (ESBL) producing *E.coli.* & *Klebsiella pneumoniae* isolated from a Tertiary Care Cancer Hospital. *National Journal of Medical Research* **4**:201:204.
10. **Chaudhary, M. & Payasi, A. (2014).** Molecular characterization and in vitro susceptibilities of β -lactamase producing *Escherichia coli.*, *Klebsiella* species., *Acinetobacter baumannii.*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* to CSE1034 and other β -lactams. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* **7S1**:S217-23.
11. **CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2014).** Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility. Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. CLSI document M100-S24. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, Wayne., PA., pp50-63.
12. **Dong, F., Xu, X.W., Song, W.Q., Lü, P., Yu, S.J., Yang, Y.H. & Shen, X.Z. (2008).** Characterization of multidrug-resistant and metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a paediatric clinic in China. *Chinese Medical Journal* **121**:1611-1616.

13. **Duan, H., Chai, T., Liu, J., Zhang, X., Qi, C., Gao, J., Wang, Y., Cai, Y., Miao, Z., Yao, M. & Schlenker, G. (2009).** Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. *Environmental research* **109**:511–517.
14. **Fernandes, T.A., Pereira, C.A.P., Petrili, A.S. & Pignatari, A.C.C. (2010).** Molecular characterization of carbapenem-resistant and metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from blood cultures from children and teenagers with cancer. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **43**:372-376.
15. **Franco, M.R.G., Caiaffa-Filho, H.H., Burattini, M.N. & Rossi, F. (2010).** Metallo-beta-lactamases among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian university hospital. *Clinics (São Paulo, Brazil)* **65**:825-829.
16. **Fukuta, Y., Muder, R.R., Agha, M.E., Clarke, L.G., Wagener, M.M., Hensler, A.M. & Doi, Y. (2013).** Risk factors for acquisition of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* among cancer patients. *American Journal of Infection Control* **41**: 1249–1252.
17. **Gales, A.C., Menezes, L.C., Silbert, S. & Sader, H.S. (2003).** Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenêmicos-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **52**:699-702.
18. **Ghamgosha, M., Zahedani, S.S., Kafilzadeh, F., Bameri, Z. (2014).** Metallo- β -lactamase genes VIM-1., SPM-1 and IMP-1 in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Zahedan Hospitals. *International Journal of Infection*. **1**:e19635.
19. **González, L.J., Moreno, D.M., Bonomo, R.A. & Vila1, A.J. (2014).** Host-specific enzyme-substrate interactions in SPM-1 metallo- β -Lactamase are modulated by second sphere residues. *PLoS pathogens* **10**:e1003817.
20. **Gudiol, C., Calatayud, L., Garcia-Vidal, C., Lora-Tamayo, J., Císnal, M., Duarte, R., Arnan, M., Marin, M., Carratalà, J. & Gudiol, F. (2010).** Bacteraemia due to extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* (ESBL-EC) in cancer patients: clinical features., risk factors., molecular epidemiology and outcome. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **65**:333-41.
21. **Guzmán-Blanco, M., Labarca, J.A., Villegas, M.V, Gotuzzo, E. & Latin America Working Group on Bacterial Resistance, (2014).** Extended spectrum β -lactamase producers among nosocomial *Enterobacteriaceae* in Latin America. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* **18**:421–433.

22. **Hafiane, A. & Ravaoarino, M. (2008).** Différentes méthodes de typage des souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées des patients atteints de mucoviscidose. *Médecine et Maladies Infectieuses* **38**:238–247.
23. **Hinrichsen, S.L., Falcão, E., Vilella, T.A.S., Lira, C., Santos-Junior, B.J. & Cruz, P.W.S. (2014).** Occurrence of *Acinetobacter* in two private tertiary hospitals in Northeastern Brazil. *Revista Panamericana de Infectología* **16**:174-179.
24. **Jacoby, G. & Bush, K. (2015).** β -Lactamase classification and amino acid sequences for TEM., SHV and OXA extended-spectrum and inhibitor resistant enzymes. Burlington: *Lahey Clinic*. [Accessed Jul 2015]. Available from: www.lahey.org/studies/
25. **Jácome, P.R.L.A., Alves, L.R., Cabral, A.B., Lopes, A.C.S. & Maciel, M.A.V. (2012a).** Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance and virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Recife., State of Pernambuco., Brazil. *Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **45**:707-712.
26. **Jácome, P.R.L.A., Alves, L.R., Cabral, A.B., Lopes, A.C.S. & Maciel, M.A.V. (2012b).** First Report of KPC-Producing *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **56**:4990.
27. **Kosmidis, C.I. & Chandrasekar, P.H. (2012).** Management of gram-positive bacterial infections in patients with cancer. *Leukemia. & Lymphoma* **53**:8-18.
28. **Lee, C.S. & Doi, Y. (2014).** Therapy of Infections due to Carbapenem-Resistant Gram-Negative Pathogens. *Infection. & Chemotherapy* **46**:149-164.
29. **Lee, J.Y., Limb, M.H., Heoc, S.T. & Koa, K.S. (2012).** Repeated isolation of *Pseudomonas aeruginosa* isolates resistant to both polymyxins and carbapenems from 1 patient. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **72**:267–271.
30. **Lin, M.F. & Lan, C.Y. (2014).** Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: From bench to bedside. *World Journal of Clinical Cases* **2**:787-814.
31. **Magill S.S., Edwards J.R., Stat M., Bamberg W. Beldavs Z.G., Dumyati G., Kainer M.A., Lynfield R., Maloney M., McAllister-Hollod L., Nadle J., Ray S.M., Thompson D.L., Wilson L.E., Fridkin, S.K. (2014).** Multistate Point-Prevalence Survey of Health Care–Associated Infections. *The New England Journal of Medicine* **370**;13 nejm.org march 27: 1198-1208.
32. **Marín, M., Gudíol, C., García-Vidal, C., Ardanuy, C. & Carratalà, J. (2014).** Bloodstream infections in patients with solid tumors: epidemiology., antibiotic therapy., and outcomes in 528 episodes in a single cancer center. *Medicine* **93**:143-9.

33. **Martins, A.F., Zavascki, A.P., Gaspareto, P.B. & Barth, A.L. (2007).** Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* Producing SPM-1-like and IMP-1-like Metallo- β -lactamases in Hospitals from Southern Brazil. *Infection* **35**:457-460.
34. **Maschmeyer, G. & Haas, A. (2008).** The epidemiology and treatment of infections in cancer patients. *International Journal of Antimicrobial Agents* **31**:193–197.
35. **Melo, M.E.S., Cabral, A.B., Maciel, M.A.V., da Silveira, V.M. & Lopes, A.C.S. (2011).** Phylogenetic groups among *Klebsiella pneumoniae* isolates from Brazil: relationship with antimicrobial resistance and origin. *Current Microbiology* **62**:1596-601.
36. **Melo, R.C.A., De Barros, E.M.R., Loureiro, N.G., De Melo, H.R.L, Maciel, M.A.V. & Lopes, A.C.S. (2014).** Presence of fimH., mrkD., and irp2 Virulence Genes in KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Recife-PE., Brazil. *Current Microbiology* **69**:10.1007/s00284--831.
37. **Mendes, R.E., Toleman, M.A., Ribeiro, J., Sader, H.S., Ronald, N., Jones, R.N. & Walsh, T.R. (2004).** Integron Carrying a Novel Metallo- β -Lactamase Gene., blaIMP-16., and a Fused Form of Aminoglycoside-Resistant Gene aac(6')-30/aac(6')-Ib': Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**:4693–4702.
38. **Miedema, K.G., Winter, R.H., Ammann, R.A., Droz, S., Spanjaard, L., de Bont, E.S., Kamps, W.A., van de Wetering, M.D. & Tissing, W.J. (2013).** Bacteria causing bacteremia in pediatric cancer patients presenting with febrile neutropenia--species distribution and susceptibility patterns. *Supportive Care in Cancer* **21**:2417-2426.
39. **Moghnieh, R., Estaitieh, N., Mugharbil, A., Jisr, T., Abdallah, D.I., Ziade, F., Sinno L. & Ibrahim, A. (2015).** Third generation cephalosporin resistant *Enterobacteriaceae* and multidrug resistant gram-negative bacteria causing bacteremia in febrile neutropenia adult cancer patients in Lebanon., broad spectrum antibiotics use as a major risk factor., and correlation with poor prognosis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **12**:5-11.
40. **Montassier, E., Batard, E., Gastinne, T., Potel, G. & de La Cochetière, M.F. (2013).** Recent changes in bacteremia in patients with cancer: a systematic review of epidemiology and antibiotic resistance. *European Journal of Clinical Microbiology. & Infectious Diseases* **32**:841-850.
41. **Morfin-Otero, R., Mendoza-Olazarán, S., Silva-Sánchez, J., Rodríguez-Noriega, E., Laca-Díaz, J., Tinoco-Carrillo, P., Petersen, L., López, P., Reyna-Flores, F., Alcantar-Curiel, D., Garza-Ramos, U. &**

- Garza-González, E. (2013).** Characterization of *Enterobacteriaceae* isolates obtained from a tertiary care hospital in Mexico., which produces extended-spectrum β -lactamase. *Microbial Drug Resistance* **19**:378-83.
42. **Nogueira, K.S., Conte, D., Maia, F.V. & Dalla-Costa, L.M. (2015).** Distribution of extended-spectrum β -lactamase types in a Brazilian tertiary hospital. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **48**:162-169.
43. **Paul, M., Shani, V., Muchtar, E., Kariv, G., Robenshtok, E. & Leibovici, L. (2010).** Systematic review and meta-analysis of the efficacy of appropriate empiric antibiotic therapy for sepsis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **54**:4851–4863.
44. **Pellegrino, F.L.P., Moreira, M.B., Nouer, S.A. (2001).** Antimicrobial resistance and genotype characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a university affiliated hospital in Rio de Janeiro., Abstract L-14. In: 101th ASM General Meeting., 2001.
45. **Pongas, G., Hamilos, G., Rolston, K.V. & Kontoyiannis, D.P. (2012).** Formal adult infectious disease specialist consultations in the outpatient setting at a comprehensive cancer center. (1998–2008): Diverse and impactful. *Supportive Care in Cancer* **20**:261–265.
46. **Quiles, M.G., Menezes, L.C., Bauab, K.C., Gimpl, E.K., Rocchetti, T.T., Palomo, F.S., Carlesse, F. & Pignatari, A.C.C. (2015).** Diagnosis of bacteremia in pediatric oncologic patients by in-house real-time PCR. *BMC Infectious Diseases* **15**:283.
47. **Quinones-Falconi, F., Galicia-Velasco, M., Marchiaro, P., Mussi, M.A., Ballerini, V., Vila, A.J., Viale, A.M., Bermejo-Morales, K., Limansky, A.S. (2010).** Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing metallo- β -lactamases of the IMP-15 and VIM-2 types in Mexico. *Clinical Microbiology and Infection* **16**:126–131.
48. **Ram, R., Farbman, L., Leibovici, L., Raanani, P., Yeshurun, M., Vidal, L., Gafter-Gvili, A., Peck, A., Shpilberg, O. & Paul, M. (2012).** Characteristics of initial compared with subsequent bacterial infections among hospitalised haemato-oncological patients. *International Journal of Antimicrobial Agents* **40**:123-126.
49. **Rasheed, J.K., Anderson, G.J., Yigit, H., Queenan, A.M., Doménech-Sánchez, A., Swenson, J.M., Biddle, J.W., Ferraro, M.J., Jacoby, G.A. & Tenover, F.C. (2000).** Characterization of the Extended-Spectrum β -lactamase Reference strain., *Klebsiella pneumoniae* K6 (ATCC 700603),, wich Produces the novel enzyme SHV-18. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**:2382-2388.
50. **Revelas A. (2012).** Healthcare – associated infections: A public health problem. *Nigerian Medical Journal* 2012 Apr-Jun; 53(2): 59–64.

51. **Sader, H.S., Reis, A.O., Silber, S., Gales, A.C. (2005).** IMPs., VIMs., SPMs: the diversity of metallo- β -lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian hospital. *Clinical Microbiology and Infection* **11**:73–76.
52. **Salabi, A.E., Toleman, M.A., Weeks, J., Bruderer, T., Frei, R. & Walsh, T.R. (2010).** First report of the metallo- β -lactamase SPM-1 in Europe. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **54**:582.
53. **Saladin, M., Cao, V.T., Lambert, T., Donay, J.L., Herrmann, J.L., Ould-Hocine, Z., Verdet, C., Delisle, F., Philippon, A., Arlet, G. (2002).** Diversity of CTX-M β -lactamases and their promoter regions from *Enterobacteriaceae* isolated in three Parisian hospitals. *FEMS Microbiology Letters* **209**:161-168.
54. **Santos-Filho, L., Santos, I., Xavier, D.E. & Menezes, L.C. (2003).** Tipagem molecular de amostras de *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de metalo- β -lactamases isoladas em João Pessoa/PB., Brasil. *Revista Brasileira de Analises Clínicas* **35**:127-131.
55. **Shahcheraghi, F., Abbasalipour, M., Feizabadi, M.M., Ebrahimipour, G.H. & Akbari, N. (2011).** Isolation and genetic characterization of metallo- β -lactamase and carbapenamase producing strains of *Acinetobacter baumannii* from patients at Tehran hospitals. *Iranian Journal of Microbiology* **3**:68-74.
56. **Scheffer, M.C., Bazzo, M.L., Steindel, M., Darini, A.L., Clímaco, E. & Dalla-Costa, L.M. (2010).** Intrahospital spread of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a University Hospital in Florianópolis., Santa Catarina., Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **43**:367-371.
57. **Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H. & Swaminathan, B. (1995).** Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology* **33**:2233-2239.
58. **Vasudevan, A., Memon, B.I., Mukhopadhyay, A., Li, J. & Tambyah, P.A. (2015).** The costs of nosocomial resistant gram negative intensive care unit infections among patients with the systemic inflammatory response syndrome- a propensity matched case control study. *Antimicrobial Resistance and Infection Control* **2**:1-8.
59. **Wang, S.S., Lee, N.Y., Hsueh, P.R., Huang, W.H., Tsui, K.C., Lee, H.C., Wu, C.J., Chang, C.M., Huang, C.C., Huang, C.C. & Ko, W.C. (2011).** Clinical manifestations and prognostic factors in cancer patients with bacteremia due to extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* or *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* **44**: 282-288.

60. **Warnke, P., Aepfelbacher, M., Fickenscher, H., Solbach, W., Steinmetz, I. & Podbielski, A. (2014).** Surveillanceberichte zu Erregern und Antibiotikaresistenzen – eine Empfehlung zur Standardisierung. *Deutsche medizinische Wochenschrift* **139**:1377-1382.
61. **Winn, J.R.W.C., Allen, S.D., Janda, W.M., Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P.C. & Woods, G. (2008).** As *Enterobacteriaceae* e Bacilos Gram-Negativos Não-fermentadores. In: Koneman Diagnostico Microbiológico, Texto e Atlas Colorido. 6ª ed. Guanabara Koogan, Brasil, pp 208-386.
62. **Wisplinghoff, H., Seifert, H., Wenzel, R.P. & Edmond, M.B. (2003).** Current trends in the epidemiology of nosocomial bloodstream infections in patients with hematological malignancies and solid neoplasms in hospitals in the United States. *Clinical Infectious Diseases* **36**:1103-1110.
63. **Yigit, H., Queenan, A.M., Anderson, G.J., Domenech-Sanchez, A., Biddle, J.W., Steward, C.D., Alberti, S., Bush, K. & Tenover, F.C. (2001).** Novel Carbapenem-Hydrolyzing β -lactamase., KPC-1., from a CarbapenemResistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; **45**:1151-1161.
64. **Zafer, M.M., Al-Agamy, M.H., El-Mahallawy, H.A., Amin, M.A. & Ashour, A.S.E.D. (2014).** Antimicrobial Resistance Pattern and Their Beta-Lactamase Encoding Genes among *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Cancer Patients. *BioMed Research International* **2014**:8 pages.

Table 1. Primers used in the research of β -lactamase genes.

Gene	Primer	Sequence (5'-3')	Annealing temperature	Number of cycles	Reference
<i>bla</i> _{SPM-1}	SPM-1 F	CCTACAATCTAACGGCGACC	55.3°C	30	Gales et al., 2003
	SPM-1 R	TCGCCGTGTCCAGGTATAAC			
<i>bla</i> _{IMP-DIA}	IMP-DIA F	GGAATAGAGTGGCTTAATTCTC	50.6°C	30	Dong et al., 2008
	IMP-DIA R	GTGATGCGTCYCCAAYTTCACT			
<i>bla</i> _{VIM-DIA}	VIM-DIA F	CAGATTGCCGATGGTGTGTTGG	56.8°C	30	Dong et al., 2008
	VIM-DIA R	AGGTGGGCCATTTCAGCCAGA			
<i>bla</i> _{KPC}	KPC-1a	TGTCACTGTATCGCCGTC	63.0°C	35	Yigit et al.2001
	KPC-1b	CTCAGTGCTCTACAGAAAACC			
<i>bla</i> _{TEM}	T1F	ATAAAATTCTTGAAGACGAAA	57.0°C	35	Rasheed et al.2000
	T2R	GACAGTTACCAATGCTTAATC			
<i>bla</i> _{CTX-MA}	CTX-M1	SCSATGTGCAGYACCAGTAA	61.0°C	35	Saladin et al.2002
	CTX-M2	CCGCRATATGRTTGGTGGTG			

Table 2. Characteristics of clinical isolates in relation to the site of the collected material, the site of hospitalization during the isolation of the pathogen, and presumptive diagnosis of the patient.

	<i>P. aeruginosa</i>		<i>Acinetobacter</i> spp.		<i>Klebsiella</i> spp.		Total	
	(N=58)		(N=36)		(N=75)		(N=169)	
Sample type	n	f	n	f	n	f	n	f
Tracheal aspirate	24	41.4%	14	38.9%	26	34.7%	64	37.9%
Blood	13	22.4%	6	16.7%	15	20.0%	34	20.1%
Urine	6	10.3%	3	8.3%	12	16.0%	21	12.4%
Tip Central Venous Catheter	5	8.6%	2	5.6%	3	4.0%	10	5.9%
Net peritoneal	1	1.7%	1	2.8%	3	4.0%	5	3.0%
Others	9	15.5%	10	27.8%	16	21.3%	35	20.7%
Site of hospitalization								
Intensive Care Unit	41	70.7%	24	66.7%	43	57.3%	108	63.9%
Medical Oncology Unit	6	10.3%	6	16.7%	15	20.0%	27	16.0%
Surgical Oncology Unit	9	15.5%	4	11.1%	14	18.7%	27	16.0%
Palliative Care Unit	1	1.7%	2	5.6%	3	4.0%	6	3.6%
Pediatric Oncology Unit	1	1.7%	0	0.0%	0	0.0%	1	0.6%
Type of solid tumor								
Bowel, colon and rectum cancer	8	10.7%	6	14.3%	11	10.8%	25	11.4%
Breast cancer	10	13.3%	7	16.7%	6	5.9%	23	10.5%
Prostate cancer	1	1.3%	8	19.0%	10	9.8%	19	8.7%
Laryngeal cancer	10	13.3%	2	4.8%	2	2.0%	14	6.4%
Brain cancer	6	8.0%	2	4.8%	4	3.9%	12	5.5%
Uterine cancer	3	4.0%	2	4.8%	4	3.9%	9	4.1%
Stomach cancer	2	2.7%	0	0.0%	7	6.9%	9	4.1%
Lung cancer	1	1.3%	3	7.1%	4	3.9%	8	3.7%
Others	17	22.7%	6	14.3%	27	26.5%	50	22.8%

Note 1: n = number, f = frequency

Note 2: Some patients had more than one infection caused by a bacterial isolate. In this case, the data concerning the site of hospitalization and presumptive diagnosis were influenced by this repetition. The data is therefore the isolate, and not the patient.

Table 3. Antimicrobial susceptibility profile of *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. and *Klebsiella* spp. strains.

Antimicrobial	<i>P. aeruginosa</i> (n=58)			<i>Acinetobacter</i> spp. (n=36)			<i>Klebsiella</i> spp. (n=77)		
	S	R	NT	S	R	NT	S	R	NT
Ampicillin	-	-	-	-	-	-	9.1%	88.3%	2.6%
Amoxicillin clavulanate	-	-	-	-	-	-	36.4%	48.1%	15.6%
Piperacillin tazobactam	51.7%	31.0%	17.2%	-	-	-	66.2%	27.3%	6.5%
Ampicillin sulbactam	-	-	-	77.8%	16.7%	5.6%	-	-	-
Aztreonam	56.9%	36.2%	6.9%	-	-	-	48.1%	49.4%	2.6%
Ceftriaxone	-	-	-	22.2%	75.0%	2.8%	37.7%	51.9%	10.4%
Ceftazidime	53.4%	36.2%	10.3%	16.7%	72.2%	11.1%	-	-	-
Cefepime	41.4%	37.9%	20.7%	22.2%	69.4%	8.3%	-	-	-
Imipenem	44.8%	53.4%	1.7%	33.3%	66.7%	0.0%	87.0%	11.7%	1.3%
Meropenem	46.6%	53.4%	0.0%	33.3%	66.7%	0.0%	85.7%	10.4%	3.9%
Amikacin	55.2%	44.8%	0.0%	63.9%	33.3%	2.8%	84.4%	14.3%	1.3%
Gentamicin	70.7%	24.1%	5.2%	63.9%	36.1%	0.0%	74.0%	24.7%	1.3%
Ciprofloxacin	44.8%	43.1%	12.1%	22.2%	77.8%	0.0%	55.8%	40.3%	3.9%
Trimethoprim sulfamethoxazole	-	-	-	58.3%	38.9%	2.8%	62.3%	35.1%	2.6%
Tetracycline	-	-	-	91.7%	8.3%	0.0%	-	-	-

Note: S = sensitive; R = Resistant; NT = not tested; - antimicrobial has not been tested in a particular bacterial genus.

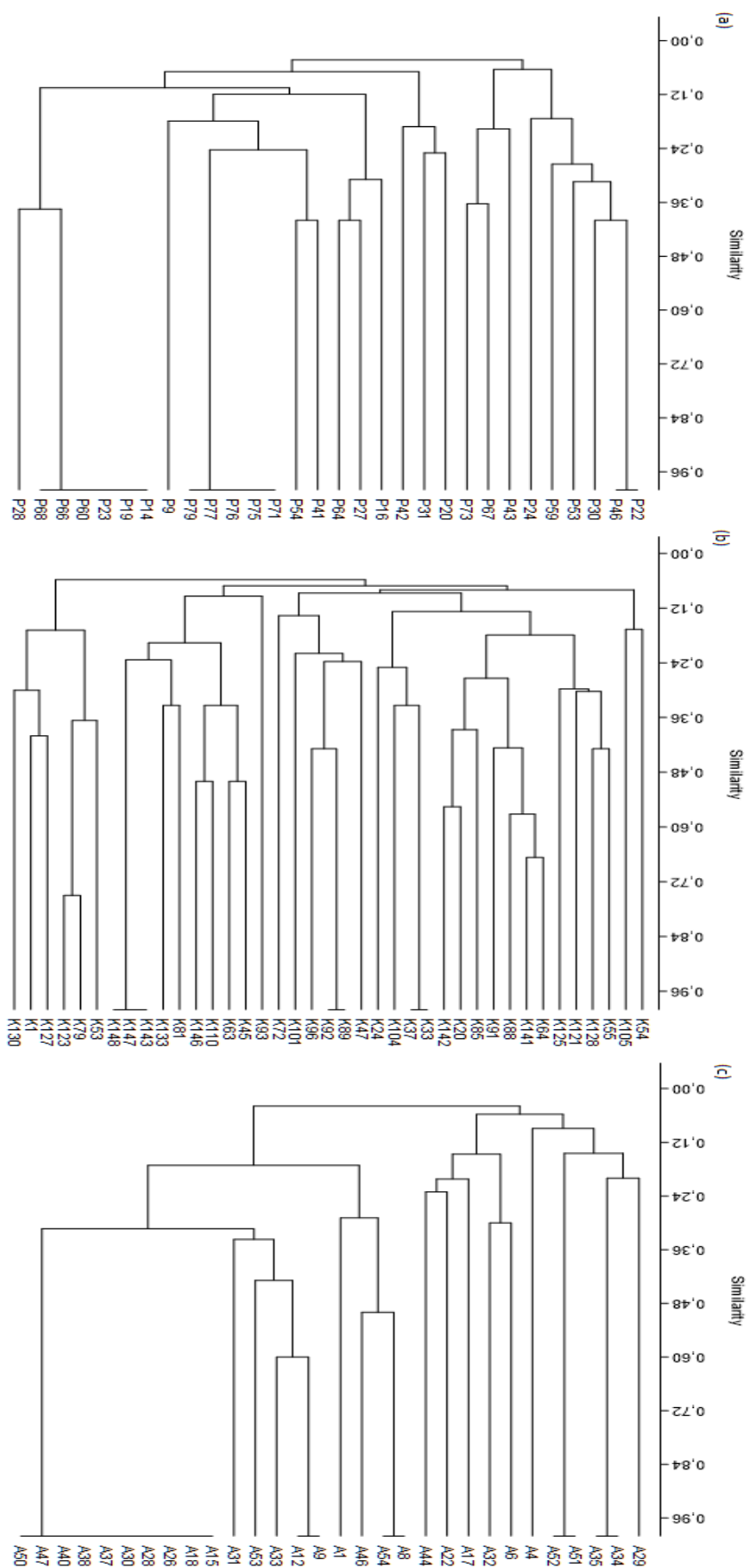
Table 4. Distribution of β -lactamase genes per bacterial pathogen.

Gene	<i>P. aeruginosa</i>		<i>Acinetobacter spp.</i>		<i>Klebsiella spp.</i>		<i>Total</i>	
	%	n/N	%	n/N	%	n/N	%	n/N
<i>bla</i> _{SPM-1}	35.5%	(11/31)	3.8%	(1/26)	0.0%	(0/15)	16.7%	(12/72)
<i>bla</i> _{IMP}	0.0%	(0/31)	0.0%	(0/26)	0.0%	(0/15)	0.0%	(0/72)
<i>bla</i> _{VIM}	0.0%	(0/31)	0.0%	(0/26)	0.0%	(0/15)	0.0%	(0/72)
<i>bla</i> _{KPC}	25.8%	(8/31)	0.0%	(0/23)	0.0%	(0/7)	13.1%	(8/61)
<i>bla</i> _{TEM}	0.0%	(0/22)	25.9%	(7/27)	30.6%	(11/36)	21.2%	(18/85)
<i>bla</i> _{CTX-M}	NT	(-/-)	NT	(-/-)	58.3%	(21/36)	58.3%	(21/36)

Note 1: % = percentage of positive strains for the gene; n = number of positive strains for the gene; N = number of selected strains for the test, according to susceptibility profile

Note 2: some strains contained more than one β -lactamase gene

Figure 1. Dendrogram based on ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-Polymerase Chain Reaction) analysis of multiresistant isolates. (a) *P. aeruginosa*; (b) *Klebsiella* spp.; (c) *Acinetobacter* spp..



Submission Confirmation for Journal of Medical Microbiology article JMM-D-15-00818 - [EMID:f089c341ac27608a]

Entrada x

JMM <em@editorialmanager.com>

22:52 (Há 16 minutos)

para mim

inglês
português

[Traduzir mensagem](#)

[Desativar para: inglês](#)

CC: lilianalves88@hotmail.com, agenorjacome@yahoo.com.br, zuitabezerra@hotmail.com, jailtonlobo@hotmail.com, psergiora@gmail.com, ana.lopes.ufpe@gmail.com, amelia57@gmail.com

Ms. No. JMM-D-15-00818

Detection of blaSPM-1, blaKPC, blaTEM e blaCTX-M genes in isolates of Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter spp. and Klebsiella spp. from cancer patients with healthcare associated infections
Paula Regina Luna de Araújo Jácome, M.D.; Lílian Rodrigues Alves, M.D.; Agenor Tavares Jácome-Júnior, PhD; Maria Jesuíta Bezerra da Silva; Jailton Lobo da Costa Lima; Paulo Sérgio Ramos Araújo, PhD; Ana Catarina Souza Lopes, PhD; Maria Amélia Vieira Maciel, PhD

Dear Mrs Jácome,

Your submission entitled "Detection of blaSPM-1, blaKPC, blaTEM e blaCTX-M genes in isolates of Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter spp. and Klebsiella spp. from cancer patients with healthcare associated infections" has been received by Journal of Medical Microbiology

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is <http://jmm.edmgr.com/>.

Your manuscript reference number is JMM-D-15-00818. Please use this in all correspondence relating to this manuscript.

Thank you for submitting your work to Journal of Medical Microbiology.

Yours sincerely,

Journal of Medical Microbiology

IMPORTANT INFORMATION:

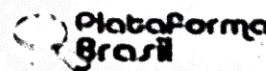
Publish ahead of print:

Journal of Medical Microbiology publishes a PDF of the author accepted manuscript online within 3 working days of acceptance, and before it is scheduled to appear in an issue, either online or in print. Please note that we cannot publish the accepted version of the manuscript without a completed Licence to Publish form. In addition, for papers reporting new sequence data, papers will not appear online in Papers in Press until the sequence data are released in public databases.

Please make sure you check the details you have entered into the Editorial Manager site very carefully, particularly the manuscript title, subject category and author details, as these will be used when your accepted PDF is published online.

ANEXO - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

**SOCIEDADE PERNAMBUCANA
DE COMBATE AO CÂNCER-
SPCC**



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE GENÉTICA DE BACTÉRIAS DE INTERESSE MÉDICO PROVENIENTES DE PACIENTES DO HOSPITAL DO CÂNCER DE PERNAMBUCO

Pesquisador: PAULO SERGIO RAMOS DE ARAUJO

Área Temática: Área 9 A critério do CEP

Versão: 2

CAAE: 05554812 7 0000 5205

Instituição Proponente: SOCIEDADE PERNAMBUCANA DE COMBATE AO CÂNCER -SPCC

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 118.131

Data da Relatoria: 09/10/2012

Apresentação do Projeto:

O estudo será realizado no Hospital do Câncer de Pernambuco (HCP) e a análise molecular amostras de interesse da pesquisa serão processadas Laboratório de Bacteriologia Molecular do Departamento de Medicina Tropical-UFPE que dispõe de toda infra-estrutura necessária para o desenvolvimento de todas as etapas da pesquisa.- Tipo de estudo: O estudo será do tipo prospectivo série de casos, obtidos no período do estudo

Objetivo da Pesquisa:

Analisar a diversidade microbiológica e genética de isolados de *P. aeruginosa*, *Acinetobacter*, *K. pneumoniae* e *Staphylococcus* spp. dos pacientes do Hospital do Câncer de Pernambuco

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não há qualquer risco à integridade dos sujeitos participantes desta pesquisa

Benefícios:

Caracterizar o perfil de resistência antimicrobiana de *P. aeruginosa*, *Acinetobacter*, *K. pneumoniae* e *Staphylococcus* spp. isolados de pacientes do Hospital de Câncer de Pernambuco assim como a diversidade genética e seu papel na disseminação intrahospitalar

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo será realizado no Hospital do Câncer de Pernambuco (HCP) e a análise molecular amostras de interesse da pesquisa serão processadas Laboratório de Bacteriologia Molecular do

Endereço: Av. Cruz Cabugá, 1597

Bairro: Santo Amaro

CEP: 50.040-000

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (813)217-8197

Fax: (813)217-8197

E-mail: cep@hcp.org.br