



Juliana F. de Carvalho Gardelli

**Aplicações de Análise de Sobrevivência em Dados
de Concentração Inibitória Mínima**

Maringá
2018

Juliana F. de Carvalho Gardelli

Aplicações de Análise de Sobrevivência em Dados de Concentração Inibitória Mínima

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioestatística do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Maringá como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioestatística. Orientador: Prof. Dr. Josmar Mazucheli.

Maringá

2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR, Brasil)

G218a Gardelli, Juliana F. de Carvalho
Aplicações de análise de sobrevivência em dados de concentração inibitória mínima / Juliana F. de Carvalho Gardelli. -- Maringá, PR, 2018.
59 f.: il. col.

Orientador: Prof. Dr. Josmar Mazucheli.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Estatística, Programa de Pós-Graduação em Bioestatística, 2018.

1. Bioestatística. 2. Concentração inibitória mínima. 3. Análise de sobrevivência. I. Mazucheli, Josmar, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Estatística. Programa de Pós-Graduação em Bioestatística. III. Título.

CDD 23.ed. 570.15195

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Josmar Mazucheli, pela orientação, por estar sempre disponível e disposto a ajudar e por suas opiniões e críticas ao trabalho.

À professora Doutora Maria Cristina Bronharo Tognim, por disponibilizar os dados e se dispor várias vezes a me explicar o significado biológico e farmacológico deste estudo.

Aos meus pais, Desgenete e Maria José, que sempre priorizaram a educação dos filhos, e aos meus irmãos, Leonardo e Emanuela, por compartilhar vivências que contribuíram para nos tornar quem somos hoje.

Ao meu marido, Daniel, pelo apoio incondicional.

Ao meu filho, Henrique, que me inspira a ser uma pessoa melhor a cada dia.

Aos meus colegas do mestrado, pelos momentos compartilhados.

Aos docentes, funcionários e amigos do DES, pelas trocas de experiências, pela compreensão e pelo apoio.

*"Todas as vitórias ocultam uma abdicação".
(Simone de Beauvoir)*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Determinação da CIM.	11
Figura 2 – Placa de microtitulação.	12
Figura 3 – Sistema Automatizado Phoenix BD.	12
Figura 4 – Método TSA Phoenix BD.	13
Figura 5 – Proporção de isolados suscetíveis e resistentes aos 5 antimicrobianos avaliados entre 2011 e 2016. A linha vermelha representa o limiar de suscetibilidade, acima dela os isolados são definidos como resistentes. O tamanho dos círculos pretos representa a proporção de isolados, quanto maiores, maior proporção de isolados com aquela CIM.	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Identificação dos grupos e distribuição da CIM dos antimicrobianos avaliados nos isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. — HUM/UEM, 2011-2016.	21
Tabela 2 – Proporção de isolados Suscetíveis(S), Intermediários(I) e Resistentes(R). <i>Staphylococcus</i> spp. testado contra os 9 antimicrobianos de primeira e segunda opção de tratamento.	22
Tabela 3 – Número de isolados de <i>Enterobacter</i> spp. por ano e por tipo de cultura. HUM/UEM, 2012-2016.	23
Tabela 4 – Número de isolados de <i>Escherichia coli</i> por ano e por tipo de cultura. HUM/UEM, 2012-2016.	24
Tabela 5 – Número de isolados de <i>Klebsiella</i> spp. por ano e por tipo de cultura. HUM/UEM, 2012-2016.	25
Tabela 6 – Distribuição da CIM para <i>Enterobacter</i> spp.. HUM/UEM, 2012-2016.	26
Tabela 7 – Distribuição da CIM para <i>Escherichia coli</i> . HUM/UEM, 2012-2016.	26
Tabela 8 – Distribuição da CIM para <i>Klebsiella</i> spp.. HUM/UEM, 2012-2016.	27
Tabela 9 – Distribuição das CIMs dos Carbapenens frente à <i>Enterobacter</i> spp.	27
Tabela 10 – Distribuição das CIMs dos Carbapenens frente à <i>Escherichia coli</i>	27
Tabela 11 – Distribuição das CIMs dos Carbapenens frente à <i>Klebsiella</i> spp.	28
Tabela 12 – Identificação dos grupos e Proporção de isolados resistentes a cada um dos antimicrobianos avaliados no HUM/UEM, 2011-2016.	35
Tabela 13 – Distribuição da CIM de <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de pacientes internados no HUM/UEM, testados para suscetibilidade contra Eritromicina, 2011-2016.	35
Tabela 14 – Proporção de isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. resistentes ao antimicrobiano Eritromicina, 2011-2016.	36
Tabela 15 – Testes de Tendência de Cochran-Armitage.	38
Tabela 16 – Estimativas dos Parâmetros do Modelo	38
Tabela 17 – Suscetibilidade <i>in vitro</i> para Ertapenem, Imipenem e Meropenem de <i>Enterobacter</i> spp., <i>Escherichia coli</i> e <i>Klebsiella</i> spp.	47

Tabela 18 – Distribuição de frequências do número de isolados por ano e por tipo de cultura para Ertapenem, Imipenem e Meropenem de <i>Enterobacter</i> ssp., <i>Escherichia coli</i> e <i>Klebsiella</i> ssp.	48
Tabela 19 – Modelos ajustados e suas respectivas sintaxes.	48
Tabela 20 – Estimativas dos parâmetros, erro padrão, intervalo de confiança e valor p para os três modelos observados para os três antimicrobianos para <i>Enterobacter</i> ssp.	49
Tabela 21 – Estimativas dos parâmetros, erro padrão, intervalo de confiança e valor p para os três modelos observados para os três antimicrobianos para <i>Escherichia coli</i>	50
Tabela 22 – Estimativas dos parâmetros, erro padrão, intervalo de confiança e valor p para os três modelos observados para os três antimicrobianos para <i>Klebsiella</i> spp..	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CIM	Concentração Inibitória Mínima
HUM	Hospital Universitário Regional de Maringá
TSA	Teste de Suscetibilidade a Antimicrobianos
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
CLSI	<i>Clinical & Laboratorial Standards Institute</i>
SCIH	Serviço de Controle de Infecção Hospitalar
IRAS	Infecções Relacionadas ao Serviço de Saúde
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
MMV	Método de Máxima Verossimilhança
EMV	Estimador de Máxima Verossimilhança
OR	<i>Odds Ratio</i> (Razão de Chances)
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Produtora de Carbapenemase
CCIH	Comissão de Controle de Infecções Hospitalares

SUMÁRIO

1	Resumo Geral	11
1.1	Introdução	11
1.1.1	A CIM como Variável Resposta Discreta	13
1.1.2	A CIM como Variável Resposta Contínua	14
1.1.2.1	Censura e Análise de Sobrevivência para Dados de CIM	15
1.2	Motivação do Estudo	16
1.3	Objetivos	17
1.3.1	Objetivo Geral	17
1.3.2	Objetivos Específicos	17
1.4	Materiais e Métodos	18
1.5	Organização do Trabalho	18
2	Bactérias Selecionadas para o Estudo	20
2.1	Os Dados	20
2.1.1	<i>Staphylococcus</i> spp.	21
2.1.2	Enterobactérias	22
2.1.2.1	Distribuição das CIMs dos Gradientes de Concentração Observados	25
2.1.2.2	Distribuição das CIMs dos Carbapenems	27
3	Avaliação da Tendência Temporal em Isolados de <i>Staphylococcus</i> spp.	29
3.1	Introdução	30
3.2	Metodologia	32
3.2.1	Teste de Tendência de Cochran-Armitage	33
3.2.2	Regressão Logística	33
3.3	Aplicação	35
3.3.1	Resultados Testes de Tendência	38
3.4	Discussão	39
4	Aplicações de Análise de Sobrevivência em Dados de CIM de Enterobactérias	41
4.1	Introdução	42
4.2	Metodologia	44
4.2.1	Análise de Sobrevivência	44
4.2.2	Função de Sobrevivência para Dados de CIM	45
4.2.3	Modelos	46

4.3	Aplicação	46
4.3.1	Resultados	51
4.4	Discussão	52
5	Considerações Finais	54
5.1	Propostas Futuras	55
	Referências	56

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Introdução

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) é resultante de ensaios de diluição de um agente, que de modo geral é um agente (LEE; WHITMORE, 1999), também denominados microdiluição em caldo. De acordo com Jaspers, Aerts e Verbeke (2013), a menor concentração da substância antimicrobiana que inibe o crescimento visível de um microrganismo define a CIM. Isto é bem representado pela Figura 1, extraída de Madigan, Martinko e Parker (2003).

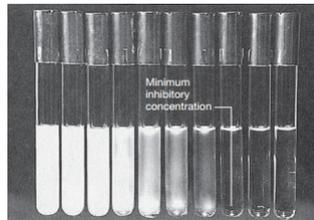


Figura 1 – Determinação da CIM.

Estes ensaios podem ser realizados com vários antimicrobianos. Por exemplo, Wu (2008) e Rollo (2011) afirmam que em alguns métodos automatizados um isolado bacteriano é exposto a concentrações crescentes de diferentes antimicrobianos, formando um gradiente de concentrações e a CIM é medida de forma altamente mecanizada, para cada antimicrobiano.

A Figura 2, extraída de <<https://www.cdc.gov/groupbstrep/lab/lab-photos.html>>, ilustra um gradiente de concentrações. Pode-se observar que cada linha, representada pelas letras A a H, refere-se a um antimicrobiano diferente e as colunas são concentrações crescentes destes antimicrobianos.

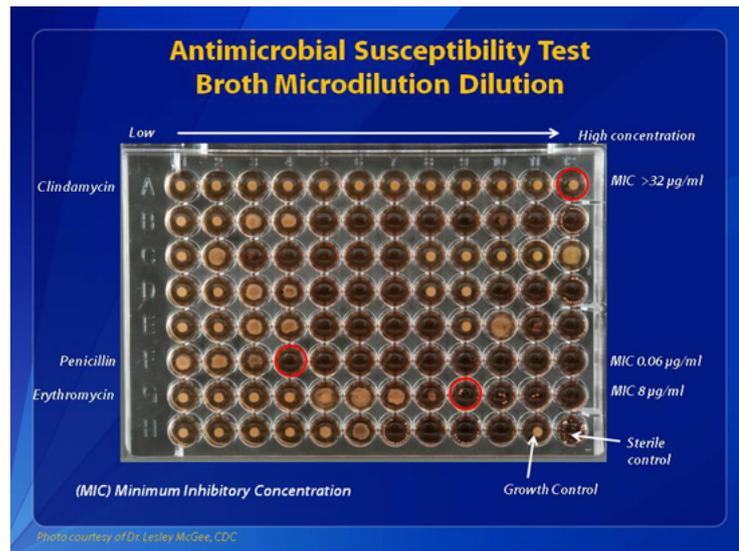


Figura 2 – Placa de microtitulação.

Os dados analisados nesta dissertação são provenientes do projeto “Vigilância Epidemiológica de Bactérias Multirresistentes no Hospital Universitário Regional de Maringá” (HUM). O método de detecção da CIM utilizado neste Hospital é o Sistema Automatizado *Phoenix BD*, ilustrado pela Figura 3, extraída de <<http://www.medicaexpo.com/pt/prod/bd/product-71022-447756.html>>. Este sistema utiliza o “Teste de Suscetibilidade a Antimicrobianos” (TSA), *BD PhoenixTM*, ilustrado pela Figura 4 extraída de <http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo2/image/figura3_mod2.jpg>



Figura 3 – Sistema Automatizado Phoenix BD.

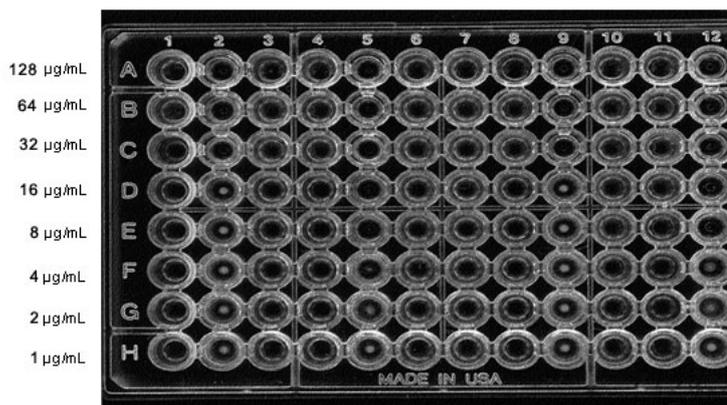


Figura 4 – Método TSA Phoenix BD.

1.1.1 A CIM como Variável Resposta Discreta

A CIM é utilizada para determinar a suscetibilidade de isolados aos antimicrobianos. [Aerts, Faes e Nysen \(2011\)](#) afirmam que a suscetibilidade pode ser definida de forma dicotômica. Se o isolado observado apresentar CIM menor do que um ponto de corte definido internacionalmente, então ele será classificado como “não resistente” ou suscetível (S), e se apresentar CIM maior, será “resistente” (R).

Estes pontos de cortes, também denominados limiares de suscetibilidade ou resistência, não são unificados mundialmente, o que segundo [Aerts, Faes e Nysen \(2011\)](#), leva a diferentes critérios e diretrizes de avaliação da resistência. Esta diferença de critérios para interpretação é o principal problema quando se deseja comparar a monitoração da resistência antimicrobiana em dados provenientes de diferentes países.

[Hombach, Bloemberg e Böttger \(2011\)](#) afirmam que tradicionalmente as bases clínicas para os TSAs categorizam a possibilidade de sucesso clínico em suscetível (S), intermediário (I) e resistente (R). No entanto, os critérios de interpretação clínicos podem variar de acordo com o órgão seguido.

Os dois órgãos internacionais de maior influência na determinação dos limiares de suscetibilidade ou resistência para cada combinação bactéria/antimicrobiano, são o *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), disponível em <http://www.eucast.org/>, e o *Clinical & Laboratorial Standards Institute* (CLSI, 2017).

Nos países que fazem parte da Comunidade Europeia, os critérios e diretrizes interpretativos utilizados são predominantemente os determinados pelo EUCAST ([AERTS; FAES; NYSEN, 2011](#)). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) tinha contrato firmado com o CLSI, <http://www.anvisa.gov.br/clsi/frmTermoCompromisso.asp>, isto acabava favorecendo com que os critérios interpretativos utilizados fossem os determinados por este instituto. No entanto, atualmente foi estabelecido o BrCast, que é um comitê próprio do Brasil e tem como base o EUCAST.

Neste trabalho os critérios de interpretação adotados para análise são os fornecidos pelo CLSI. Este órgão publica todos os anos um documento atualizado com os valores de CIM que devem ser adotados como pontos de corte (*breakpoints*) para todas as bactérias.

O uso da CIM de forma dicotomizada R ou S, ou em três categorias S, I ou R, caracteriza uma variável resposta discreta. Esta abordagem é atraente estatisticamente pela sua simplicidade, pois de acordo com [Aerts, Faes e Nysen \(2011\)](#), respostas dicotômicas podem ser analisadas com Regressão Logística ou modelo de regressão de Cox com os quais é possível relacionar a resposta dicotomizada com as covariáveis observadas. E um modelo de Regressão Logística pode ser estendido para mais de duas categorias, Regressão Logística Multinomial, no qual uma categoria é definida como *baseline* ([AGRESTI, 2002](#)).

A abordagem discreta é passível de críticas. [Rollo \(2011\)](#) afirma que o uso da categoria intermediária gera uma grande discrepância na classificação dos isolados. Na tentativa de resolver este problema alguns autores optam por considerar apenas duas categorias S e R, contudo, segundo esta autora, o uso da dicotomia simplificada nem sempre reflete o espectro real de resistência que existe nas amostras.

Outro problema apontado por [Rollo \(2011\)](#) são as mudanças que ocorrem nos pontos de corte estabelecidos. A documentação do CLSI passa por avaliações e modificações periódicas (anuais) para acompanhar os avanços nas tecnologias, procedimentos, métodos e protocolos que afetam o laboratório ou os serviços de saúde e com isto, os pontos de corte estabelecidos podem variar de um ano para outro.

E ainda, um último problema que deve ser ressaltado, citado por [Aerts, Faes e Nysen \(2011\)](#) é que com a abordagem dicotômica há a perda de informação nas tendências da distribuição da CIM acima ou abaixo do ponto de corte. As mudanças que ocorrem abaixo ou acima do limiar sem alterar a classificação da resposta não serão observadas. Para detectar tais alterações a escala quantitativa completa de distribuição da CIM precisa ser considerada.

1.1.2 A CIM como Variável Resposta Contínua

Um dos motivos de se trabalhar com a distribuição completa das CIMs, de acordo com [Rollo \(2011\)](#), é que o uso de valores de CIM remove a subjetividade associada à escolha de pontos de interrupção que definem um isolado como suscetível ou resistente.

Um dos métodos de Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos (TSA) consiste num teste de microdiluição em caldos com concentrações crescentes, em geral na forma $\log_2 2^x$ para $x = -3, -2, \dots, 9, 10$ — gerando concentrações de 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512 e 1024 mg/L. A primeira concentração que não é observada turbidez — crescimento — define a CIM.

[Annis e Craig \(2005\)](#) defendem que no método de diluição, a CIM é fixada como o valor do limite superior do intervalo e este procedimento implicitamente arredonda os dados

para cima, e portanto, a inferência baseada nestas medições é tendenciosa e superestima a resistência bacteriana a um fármaco. Para evitar este problema de superestimação da CIM, é preciso considerar que as concentrações avaliadas nos ensaios de diluição funcionam como intervalos censurados. Deste modo, a CIM pode ser avaliada numa escala contínua de valores.

De acordo com [Wu \(2008\)](#), este processo de detecção da CIM retorna uma resposta censurada à esquerda, intervalarmente ou à direita. Por exemplo, uma CIM de 8 mg/L indica que seu valor real encontra-se entre 4 e 8 mg/L . Devida a esta particularidade, dados de CIM podem ser analisados via procedimentos usuais de Análise de Sobrevida.

1.1.2.1 Censura e Análise de Sobrevida para Dados de CIM

A Análise de Sobrevida é um conjunto de procedimentos estatísticos para análise do tempo até a ocorrência de um evento de interesse ([KLEIN; MOESCHBERGER, 2005](#)). A principal característica de dados de sobrevida é a presença da censura. O evento pode ser a morte, a reincidência da doença, a entrada em remissão, a recuperação, dentre outros.

Na aplicação de Análise de Sobrevida em dados de CIM, as concentrações dos antimicrobianos testados são utilizadas como a variável tempo, e a inibição do crescimento bacteriano caracteriza o evento. Se os isolados que apresentam crescimento na maior concentração testada são definidos como não inibidos.

De acordo com [Lee e Wang \(2003\)](#), muitos pesquisadores consideram a análise de dados de sobrevida apenas uma aplicação de dois métodos estatísticos convencionais: Paramétrico, se a distribuição dos tempos de sobrevida é conhecida, e Não Paramétrico se a distribuição é desconhecida.

O estimador não-paramétrico proposto por [Kaplan e Meier \(1958\)](#), é o mais conhecido e usado em Análise de Sobrevida. Sua principal vantagem é não requerer uma suposição sobre a distribuição de probabilidade da variável censurada. A vantagem deste estimador está na flexibilidade para lidar com qualquer distribuição ([CUNHA; MELO, 2012](#); [WIENKE, 2010](#)). A desvantagem, segundo estes autores, é que ele é utilizado para dados censurados à direita. E como dados de CIM apresentam os três tipos de censura, esta abordagem não foi considerada neste trabalho.

Sob o ponto de vista da Análise de Sobrevida paramétrica muitos trabalhos na literatura consideram que dados de CIM seguem distribuição Log-Normal. Dentre eles cita-se, sem ser exaustivos: [Lee e Whitmore \(1999\)](#), [Annis e Craig \(2005\)](#), [Turnidge, Kahlmeter e Kronvall \(2006\)](#), [Wu \(2008\)](#), [Rollo \(2011\)](#), [Aerts, Faes e Nysen \(2011\)](#), [Kasstele et al. \(2012\)](#), [Cortinhas et al. \(2013\)](#). Sob esta suposição tem-se que o logaritmo da CIM é uma variável aleatória normalmente distribuída com média que pode ser dependente de covariáveis.

Nesta direção, os dados de CIM são analisados por meio de modelos de regressão, usados para avaliar se existe alguma relação entre a média da $\log(\text{CIM})$ e as covariáveis obser-

vadas.

1.2 Motivação do Estudo

A resistência antimicrobiana é o principal efeito indesejável do uso antimicrobiano em humanos e animais. Isto tem se tornado um dos principais fardos da saúde pública das últimas décadas e por isso, é extremamente importante estudar e monitorar o surgimento de isolados com suscetibilidade reduzida (JASPERS; AERTS; VERBEKE, 2013).

Uma consequência desta capacidade das bactérias desenvolverem resistência a antimicrobianos, é o surgimento de bactérias multirresistentes, que segundo Levy et al. (2004), são as responsáveis pela alta incidência de infecções hospitalares.

Dentre as bactérias multirresistentes existe um grupo, que de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), é um grave problema clínico e epidemiológico nas diversas instituições de saúde. Este grupo é constituído pelas bactérias que apresentam resistência aos Carbapenems, antimicrobianos beta-lactâmicos, que segundo Azevedo (2014), atuam destruindo a parede celular bacteriana e portanto apresentam pouca toxicidade ao organismo humano.

Dentre as várias enzimas degradadoras de antimicrobianos as Carbapenemase, particularmente a enzima conhecida como *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC), tem uma importância relevante. Sheng et al. (2010) e Oliveira e Stranieri (2011) afirmam que esta carbapenemase foi encontrada pela primeira vez em 1996 nos Estados Unidos em isolados de *Klebsiella pneumoniae*, dando origem ao nome. Esta enzima, quando presente nas bactérias, proporciona resistência aos carbapenems, que são os antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções hospitalares graves (POSSEBON; CAMARGO, 2003). De acordo com He et al. (2015), os carbapenems, são muitas vezes o último recurso para o tratamento de infecções causadas por bactérias multirresistentes. A detecção da KPC nas enterobactérias é realizada utilizando a CIM para verificar a resistência aos carbapenems.

Alguns estudos que serviram de referencial teórico para este trabalho são elencados a seguir:

Aerts, Faes e Nysen (2011) estudaram as tendências temporais na resistência bacteriana, utilizando vários métodos estatísticos para análise de dados de CIM. Métodos específicos para variável discreta (dicotômica), como: Teste de Tendência de Cochran-Armitage, Teste de Cochran-Mantel-Haenzel, Regressão Logística, Modelo logístico generalizado, Modelo de Odds Proporcional. Também apresentaram métodos baseados em Modelos de Mistura para análise da CIM enquanto variável resposta contínua e censurada. Eles utilizaram os pontos de corte estabelecidos pelo EUCAST.

Rollo (2011) fez uma revisão bibliográfica rigorosa para avaliar e apontar problemas

metodológicos de estudos com dados de CIM.

Lee e Whitmore (1999), foram os primeiros autores a propor que dados provenientes de ensaios de diluição não são dados de contagem, como eram considerados até então, e sim de medições contínuas. Eles desenvolveram a metodologia estatística, baseada em 3 pressupostos simples, utilizados até hoje nos estudos de ensaios de diluição. A partir deste pressupostos foi possível determinar como realizar a análise de verossimilhança e estimar os parâmetros em dados de diluição em série, que incluem dados de CIM.

Annis e Craig (2005) utilizaram a transformação $Y = \log_2(\text{CIM})$ supondo que a variável Y segue uma distribuição Normal. Os autores assumem que as observações estão sujeitas a erros de medição causados por variações no tamanho do inóculo, tempo de incubação, temperatura e outros fatores ambientais. Eles adotam a suposição que, após a transformação, esse erro de medição é normalmente distribuído.

Kasstele et al. (2012) analisaram os dados de CIM da Ciprofloxacina, Penicilina e Tetraciclina para a estirpe *Neisseria gonorrhoeae*. O estudo foi realizado em dezessete laboratórios para avaliar a suscetibilidade regional desta bactéria na Holanda. Estes autores também utilizaram a transformação $Y = \log_2(\text{CIM})$, supondo que a variável Y segue uma distribuição Normal. Um modelo de regressão foi ajustado utilizando a função `survreg` do R. Neste modelo foi considerado que a média da $\log_2(\text{CIM})$ é uma função da estirpe, do agente microbiano e do meio de cultura. O modelo de regressão foi expandido para um modelo de regressão multinível. A estirpe, agente antimicrobiano e meio de cultivo foram tratados como efeitos fixos, enquanto os laboratórios foram tratados como efeito aleatório.

Cortinhas et al. (2013) utilizaram métodos Não Paramétricos para analisar a distribuição da CIM da Cefapirina, do Ceftiofur e dos seus metabólitos ativos: Desacetilcefapirina e Desfuroilceftiofur. Para as curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier, o tempo foi definido como as CIMs, e a hipótese nula de nenhuma diferença nos estratos de sobrevivência (concentração antimicrobiana) foi testada através dos testes log-rank e Wilcoxon.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo Geral

Utilizar diferentes metodologias estatísticas para analisar e modelar dados de CIM.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a tendência temporal (aumento ou diminuição da resistência bacteriana) na bactéria *Staphylococcus* spp., entre os anos de 2011 e 2016, utilizando Teste de Tendência de Cochran-Armitage e um modelo de Regressão Logística.

- Propor metodologia apropriada de Análise de Sobrevivência para avaliar o comportamento da média da variável resposta $Y = \log(\text{CIM})$, avaliada de forma contínua e censurada.
- Aplicar a metodologia proposta em dados reais de enterobactérias das espécies: *Enterobacter* spp., *Escherichia coli* e *Klebsiela* spp., avaliando o comportamento da resposta quando covariáveis são adicionadas ao modelo.

1.4 Materiais e Métodos

Os dados utilizados neste trabalho são provenientes do projeto “Vigilância epidemiológica de bactérias multirresistentes no Hospital Universitário Regional de Maringá”. Foram coletados entre os anos de 2011 e 2016. Este projeto foi aprovado pelo parecer 621/2011 COPEP – CAAE 318.093.000 – 11 do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Maringá – Paraná. Todas as amostras foram previamente identificadas pelo sistema automatizado Phoenix-BD (Becton Dickinson and Company/USA). Os dados estão armazenados no banco de dados Epicenter do equipamento “Phoenix”. Somente um isolado por paciente foi incluído no estudo.

Para avaliar a tendência temporal na bactéria *Staphylococcus* spp. foram utilizados Teste de Tendência de Cochran-Armitage e um modelo de Regressão Logística. Neste caso, a variável resposta CIM é abordada de forma dicotômica (S ou R), os pontos de corte considerados foram os fornecidos pelo CLSI para os respectivos anos. Como o CLSI utiliza a categoria intermediária (I), para dicotomizar os dados, os valores desta categoria são considerados como resistentes (R), por estarem acima do limiar de suscetibilidade. Esta metodologia está implementada nas PROC FREQ e PROC LOGISTIC no SAS (STUDIO, 2015).

Para avaliar o comportamento da média da $\log(\text{CIM})$ das enterobactérias supracitadas, durante os anos de 2012 e 2016, foram utilizados métodos paramétricos de Análise de Sobrevivência, implementados na PROC LIFEREG (STUDIO, 2015).

1.5 Organização do Trabalho

O trabalho está organizado como segue: no Capítulo 2 é apresentada uma breve análise descritiva dos dados que serão analisados nos Capítulos 3 e 4. No Capítulo 3 são apresentados em detalhes os testes utilizados para análise da CIM como variável dicotômica: Teste de Tendência de Cochran-Armitage e um modelo de Regressão Logística. Estas metodologias foram aplicadas para avaliar a tendência temporal na bactéria *Staphylococcus* spp., isolada de pacientes internados no HUM entre os anos de 2011 e 2016.

No Capítulo 4 foi apresentada detalhadamente a metodologia estatística de Análise de Sobrevivência e sua aplicação nas enterobactérias *Enterobacter* spp., *Escherichia coli* e *Klebsi-*

ela spp.. O objetivo deste capítulo foi comparar a CIM de isolados obtidos por cultura de vigilância, com isolados obtidos por cultura clínica. No Capítulo 5 são apresentadas as considerações finais e propostas de estudos futuros.

Os capítulos 3 e 4 foram desenvolvidos como manuscritos com o objetivo de serem encaminhados para publicação.

CAPÍTULO 2

BACTÉRIAS SELECIONADAS PARA O ESTUDO

2.1 Os Dados

Os dados analisados neste trabalho são provenientes do projeto ‘Vigilância Epidemiológica de Bactérias Multirresistentes no Hospital Universitário Regional de Maringá’. O banco de dados é constituído por 33 espécies de bactérias das quais foram selecionadas espécies de 3 gêneros de enterobactérias: *Enterobacter* spp., *Escherichia* spp. e *Klebsiela* spp. e as espécies do gênero *Staphylococcus* spp..

Como descrito em [Zarpellon \(2015\)](#), o HUM conta com um Serviço de Controle de Infecção Hospitalar (SCIH) atuante, e os dados fornecidos por este órgão apontam como principais causadores de infecções bacterianas no HUM os seguintes patógenos: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* sp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. e *Enterococcus* spp..

No banco de dados analisado é possível observar que o patógeno *Staphylococcus aureus* é claramente o maior causador de infecções bacterianas no HUM. Foram 9191 observações de *Staphylococcus* spp. nos gradientes de concentração. Isso vai de encontro à afirmação de [Santos et al. \(2007\)](#), que esta é uma das espécies de maior importância no quadro das infecções hospitalares e comunitárias. Devido a isto, esta bactéria foi escolhida para a primeira análise apresentada.

[Zarpellon \(2015\)](#) afirma também que o alarmante crescimento e disseminação de cepas de *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase do tipo KPC, tem sido destaque na literatura mundial. Então a escolha das enterobactérias se deve ao interesse no estudo do KPC. Ainda de acordo com esta autora, o gene *bla_{KPC}* ocorre mais comumente em *K. pneumoniae*, mas há relatos de sua presença em outras espécies de enterobactérias como *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, dentre outras, por isso foram escolhidas as três espécies supracitadas.

2.1.1 *Staphylococcus* spp.

Na Tabela 1 é apresentado o gradiente completo das CIMs obtidas para esta bactéria. Foram 9191 observações, 16 antimicrobianos testados e 9 concentrações, de 0.125mg/L a 32 mg/L. Estes antimicrobianos são identificados pelo CLSI de acordo com a opção de tratamento: primeira (A), segunda (B) e terceira (C). Se são para tratamento da bactéria no trato urinário (U) ou se são associados a outro antimicrobiano (O). Esta classificação está representada na tabela por Grupo.

Tabela 1 – Identificação dos grupos e distribuição da CIM dos antimicrobianos avaliados nos isolados de *Staphylococcus* spp. — HUM/UEM, 2011-2016.

Antibiótico	Grupo	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32
Amikacin	O	0	0	0	1	0	0	1	0	0
Ampicillin	C	0	0	0	9	0	0	0	2	0
Clindamicina	A	0	1	411	4	2	372	0	0	0
Daptomicina	B	0	140	646	84	2	1	0	0	0
Eritromicina	A	0	5	324	10	4	555	0	0	0
Gentamicin	O	0	0	0	0	17	0	20	0	0
Linezolid	B	0	0	3	323	512	112	0	0	0
Minociclina	B	0	0	1	513	104	7	5	1	0
Moxifloxacina	C	0	1	39	21	14	12	0	0	0
Nitrofurantoin	U	0	0	0	0	0	0	0	46	0
Oxacilina	A	65	122	205	29	58	467	0	0	0
Penicilina.g	A	0	11	22	687	1	0	4	0	0
Quinop.dalfop	O	0	15	246	114	3	0	0	0	0
Rifampicina	B	0	0	878	11	59	0	0	0	0
Tetracycline	B	0	0	663	59	56	27	123	0	0
Vancomicina	B	0	0	181	667	83	8	0	0	1

Deste gradiente apresentado acima, foram seleccionados apenas os antimicrobianos determinados pelo CLSI como primeira e segunda opção de tratamento, resultando na Tabela 2. Como a metodologia estatística abordada na análise destas observações é baseada na resposta categorizada, na Tabela 2 pode ser observada também a quantidade de isolados S, I e R, e os pontos de corte determinados pelo CLSI para os respectivos anos. Por exemplo, para o antimicrobiano Clindamicina, se a CIM observada for $\leq 0.5\text{mg/L}$, o isolado é definido como S, se for $[1, 2]\text{mg/L}$ o isolado é definido como I e se a CIM $\geq 4\text{mg/L}$ o isolado é definido como R. Na penúltima coluna observa-se a proporção de R, mas como os dados serão analisados dicotomizados, na última coluna pode-se observar a proporção de R incluindo os I.

Tabela 2 – Proporção de isolados Suscetíveis(S), Intermediários(I) e Resistentes(R). *Staphylococcus* ssp. testado contra os 9 antimicrobianos de primeira e segunda opção de tratamento.

Antibiótico	Critério de Interpretação da CIM fornecido pelo CLSI			Total	Proporção de Resistentes	
	S (mg/L)	I(mg/L)	R (mg/L)		R(%)	R+I(%)
Clindamicina	412 ($\leq .5$)	6 (1-2)	372 (≥ 4)	790	47.08	47.85
Daptomicina	870 (≤ 1)	0 (-)	3 (-)	873	00.34	00.34
Eritromicina	297 ($\leq .5$)	18 (1-4)	496 (≥ 8)	898	63.36	63.36
Linezolid	950 (≤ 4)	0 (-)	0 (≥ 8)	950	-	-
Minociclina	625 (≤ 4)	5 (8)	2 (≥ 16)	631	00.16	00.95
Oxacilina	946 (≤ 2)	0 (-)	0 (≥ 4)	946	-	-
Penicilina g.	0 ($\leq .12$)	0 (-)	725 ($\geq .25$)	725	100	100
Rifampicina	889 (≤ 1)	59 (2)	0 (≥ 4)	948	-	06.22
Tetracycline	805 (≤ 4)	123 (8)	0 (≥ 16)	928	-	13.25
Vancomicina	931 (≤ 2)	8 (4-8)	1 (≥ 16)	940	00.12	00.95

Como o interesse deste estudo é avaliar a tendência temporal na resistência, serão excluídos ainda, os antimicrobianos: Daptomicina, Linezolid, Minociclina, Oxacilina e Vancomicina, pois como pode ser observado na Tabela 2, apresentam menos de 1% de isolados resistentes. Outro antimicrobiano que deve ser excluído é a Penicilina g., pois a proporção de resistentes é 100%, e não dá para avaliar tendência se todos os isolados são resistentes ao longo dos anos. Os quatro antimicrobianos resultantes podem ser observados na Tabela 12, no capítulo 3, no qual é realizada a análise de tendência.

2.1.2 Enterobactérias

Os isolados de *Enterobacter* sp. foram testados para 25 antimicrobianos. Para a cultura clínica foram observadas 7 concentrações, de 1mg/L a 64mg/L e para a cultura de vigilância foram 8 concentrações, de 0.25mg/L a 32mg/L. Os isolados de *Escherichia coli* foram testados para 22 antimicrobianos. Para a cultura clínica foram observadas 9 concentrações, de 0.25mg/L a 64 mg/L e para a cultura de vigilância foram 8 concentrações, de 0.25mg/L a 32 mg/L. Os isolados de *Klebsiela* sp. foram testados para 21 antimicrobianos. Para a cultura clínica foram observadas 8 concentrações, de 0.5mg/L a 64 mg/L e para a cultura de vigilância foram 10 concentrações, de 0.125mg/L a 64 mg/L.

Nas Tabelas 3, 4 e 5 pode-se observar quais os antimicrobianos formaram os gradientes de concentração para cada uma das três espécies, quantos isolados foram observados por ano e por tipo de cultura.

Tabela 3 – Número de isolados de *Enterobacter* spp. por ano e por tipo de cultura. HUM/UEM, 2012-2016.

Antibiótico	Amostra Clínica (n)					Amostra de Vigilância (n)				
	2012	2013	2014	2015	2016	2012	2013	2014	2015	2016
Amikacin	2	13	4	2	0	9	14	28	21	28
Ampicillin	0	0	0	0	0	9	19	28	23	31
Cefazolin	1	1	0	0	0	9	14	27	2	0
Cefepime	4	2	1	0	1	9	14	26	20	24
Cefotaxime	0	1	0	0	0	8	11	19	2	0
Cefoxitina	0	0	0	0	1	9	14	28	22	27
Ceftazidime	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0
Ceftriaxone	0	3	0	0	0	9	14	28	21	29
Cefuroxime	0	0	0	0	0	1	3	8	19	28
Ciprofloxacin	2	2	1	0	1	9	14	28	22	29
Colistina	0	0	0	0	0	0	0	0	1	8
Daptomicina	0	0	0	0	0	0	5	0	2	0
Ertapenem	2	3	6	4	2	6	9	19	19	26
Gentamicin	2	1	0	0	0	9	14	28	22	29
Imipenem	0	2	1	3	6	7	9	22	17	22
Levofloxacin	4	3	3	0	2	9	14	28	22	28
Linezolid	0	0	0	0	0	0	5	0	2	2
Meropenem	0	1	0	1	1	4	6	21	13	21
Nitrofurantoin	4	2	6	2	3	0	0	0	0	0
Penicilina	0	0	0	0	0	0	5	0	2	2
Tetracycline	1	1	2	0	0	1	0	3	0	0
Tigeciclina	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
Tobramycin	0	2	1	0	0	9	14	27	2	0
Vancomicina	0	0	0	0	0	0	3	0	2	2

Tabela 4 – Número de isolados de *Escherichia coli* por ano e por tipo de cultura. HUM/UEM, 2012-2016.

Antibiótico	Amostra Clínica (n)					Amostra de Vigilância (n)				
	2012	2013	2014	2015	2016	2012	2013	2014	2015	2016
Amikacin	124	81	69	12	3	0	2	7	9	12
Ampicillin	114	70	68	12	2	0	2	7	9	11
Cefazolin	125	73	71	12	0	0	2	7	1	0
Cefepime	100	62	51	12	2	0	2	5	7	12
Cefotaxime	104	32	51	0	0	0	1	5	1	0
Cefoxitina	122	85	85	16	9	0	2	7	8	11
Ceftazidime	66	26	9	6	2	0	0	0	4	1
Ceftriaxone	114	28	56	1	2	0	2	7	9	12
Cefuroxime	12	1	4	0	2	0	1	2	8	12
Ciprofloxacin	122	75	75	12	2	0	2	7	9	12
Colistina	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2
Ertapenem	108	74	67	17	8	0	1	4	9	10
Gentamicin	119	71	69	12	2	0	2	7	9	12
Imipenem	118	71	62	12	7	0	1	7	7	11
Levofloxacin	119	71	68	12	2	0	2	7	9	12
Meropenem	118	73	71	13	2	0	1	5	7	9
Nitrofurantoin	93	66	48	13	2	0	0	0	0	0
Polimixina.b	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Tetracycline	52	30	46	2	0	0	0	2	0	0
Tigeciclina	0	0	0	2	11	0	0	0	1	0
Tobramycin	120	76	74	13	0	0	2	7	1	0

Tabela 5 – Número de isolados de *Klebsiella* spp. por ano e por tipo de cultura. HUM/UEM, 2012-2016.

Antibiótico	Amostra Clínica (n)					Amostra de Vigilância (n)				
	2012	2013	2014	2015	2016	2012	2013	2014	2015	2016
Amikacin	6	11	1	0	1	10	29	51	73	65
Ampicillin	0	0	0	0	0	10	29	51	70	64
Aztreonam	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Cefazolin	7	5	3	0	0	10	29	51	7	0
Cefepime	0	0	1	0	0	9	23	32	52	34
Cefotaxime	0	2	1	0	0	10	23	40	5	0
Cefoxitina	8	19	17	4	7	10	29	50	73	63
Ceftazidime	0	0	1	0	0	0	0	1	13	5
Ceftriaxone	0	0	0	1	0	10	29	50	73	65
Cefuroxime	0	1	0	0	0	0	6	13	64	63
Ciprofloxacin	4	5	7	0	0	10	29	51	72	65
Colistina	0	0	0	0	0	0	0	0	4	27
Ertapenem	2	4	3	5	6	10	21	38	70	63
Gentamicin	1	1	1	0	0	10	29	51	72	65
Imipenem	0	1	0	0	5	8	23	38	46	43
Levofloxacin	1	1	0	0	0	10	29	51	73	65
Meropenem	0	3	3	1	0	8	26	45	56	48
Nitrofurantoin	9	10	8	1	2	0	0	0	0	1
Polimixina.b	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Tetracycline	0	4	10	0	0	0	3	5	2	0
Tigeciclina	0	0	0	2	11	0	0	0	2	4
Tobramycin	2	6	6	1	0	9	29	51	7	0

2.1.2.1 Distribuição das CIMs dos Gradientes de Concentração Observados

A Distribuição das CIMs para os antimicrobianos testados, separadas por tipo de cultura, pode ser observada nas Tabelas 6, 7 e 8.

Tabela 6 – Distribuição da CIM para *Enterobacter* spp.. HUM/UEM, 2012-2016.

Antibióticos	Amostras Clínicas							Amostras de Vigilâncias							
	1	2	4	8	16	32	64	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32
Amikacin	0	0	0	0	15	7	0	0	0	1	0	0	68	6	27
Ampicillin	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	3	1	1	107	0
Aztreonam	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cefazolin	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	52	0
Cefepime	0	5	1	2	3	0	0	0	0	17	2	1	3	72	0
Cefotaxime	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	40
Cefoxitina	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	102	0
Ceftazidime	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0
Ceftriaxone	0	0	0	0	1	2	0	0	0	1	0	0	0	0	102
Cefuroxime	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	61	0
Ciprofloxacin	3	5	0	0	0	0	0	0	44	1	59	0	0	0	0
Colistina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0	0	0	0	0
Daptomicina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	2	0	0	0
Ertapenem	7	5	6	0	0	0	0	1	2	3	7	68	0	0	0
Gentamicin	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	50	1	53	0	0
Imipenem	0	11	0	1	0	0	0	0	0	37	8	12	21	0	0
Levofloxacin	1	6	9	0	0	0	0	0	0	46	4	53	0	0	0
Linezolid	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	4	0	0	0	0
Meropenem	0	2	1	0	0	0	0	0	0	35	3	11	16	0	0
Nitrofurantoin	0	0	0	0	0	13	10	0	0	0	0	0	0	0	0
Penicilina.g	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0	0
Tetracycline	0	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
Tigeciclina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0
Tobramycin	0	0	1	3	0	0	0	0	0	0	21	1	30	0	0
Vancomicina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7

Tabela 7 – Distribuição da CIM para *Escherichia coli*. HUM/UEM, 2012-2016.

Antibióticos	Amostras Clínicas							Amostras de Vigilâncias									
	0.25	0.5	1	2	4	16	32	64	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	
Amikacin	0	0	0	0	0	536	37	30	0	0	0	1	0	0	27	1	1
Ampicillin	0	0	0	2	156	4	390	0	0	0	0	0	0	0	0	29	0
Aztreonam	0	0	0	75	4	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Cefazolin	0	0	0	268	49	27	231	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0
Cefepime	0	0	415	4	0	5	86	0	0	0	0	1	0	0	1	24	0
Cefotaxime	0	0	0	0	230	13	3	107	0	0	0	0	0	0	0	0	7
Cefoxitina	0	0	0	0	333	184	84	0	0	0	0	0	0	0	2	26	0
Ceftazidime	0	204	7	4	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0
Ceftriaxone	0	0	4	337	2	6	9	138	0	0	0	0	0	0	0	0	30
Cefuroxime	0	0	0	0	105	17	27	0	0	0	0	0	0	0	0	23	0
Ciprofloxacin	0	204	49	293	0	0	0	2	0	0	5	0	25	0	0	0	0
Colistina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0
Ertapenem	3	402	10	4	12	0	0	2	1	0	0	0	23	0	0	0	0
Gentamicin	0	0	1	454	9	136	0	0	0	0	1	19	0	10	0	0	0
Imipenem	0	0	579	10	9	5	0	0	0	0	19	4	0	3	0	0	0
Levofloxacin	0	0	302	16	281	0	0	0	0	0	5	0	25	0	0	0	0
Meropenem	0	0	587	7	2	10	0	0	0	0	14	1	1	6	0	0	0
Nitrofurantoin	0	0	0	0	0	0	290	50	31	0	0	14	1	1	6	0	0
Polimixina.b	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	14	1	1	6	0	0
Tetracycline	0	0	0	115	17	132	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
Tigeciclina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Tobramycin	0	0	0	419	11	159	0	0	0	0	0	4	1	5	0	0	0

Tabela 8 – Distribuição da CIM para *Klebsiella* spp.. HUM/UEM, 2012-2016.

Antibióticos	Amostras Clínicas								Amostras de Vigilâncias								
	0.5	1	2	4	8	16	32	64	0.125	0.5	1	2	4	8	16	32	64
Amikacin	0	0	0	0	16	19	12	0	0	0	3	0	0	143	26	59	0
Ampicillin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	227	0	0
Aztreonam	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Cefazolin	8	7	8	7	9	3	0	0	0	0	0	1	0	0	98	0	0
Cefepime	0	11	0	0	1	0	0	0	0	0	9	0	0	0	144	0	0
Cefotaxime	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	78	0
Cefoxitina	0	0	0	13	44	24	0	0	0	0	0	0	1	2	225	0	0
Ceftazidime	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18	1	0
Ceftriaxone	0	0	11	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	2	0	227	0
Cefuroxime	0	0	0	11	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	147	0	0
Ciprofloxacina	0	5	13	0	0	0	0	0	0	19	0	211	0	0	0	0	0
Colistina	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	31	0	0	0	0	0	0
Ertapenem	0	8	4	10	0	0	0	0	0	2	0	7	196	0	0	0	0
Gentamicin	0	0	11	3	0	0	0	0	0	0	0	42	1	186	0	0	1
Imipenem	0	22	2	7	0	0	0	0	0	0	55	36	25	44	0	0	0
Levofloxacina	0	11	4	2	0	0	0	0	0	0	25	2	204	0	0	0	0
Meropenem	0	23	4	1	2	0	0	0	0	0	27	12	36	111	0	0	0
Nitrofurantoin	0	0	0	0	0	0	18	17	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Tetracycline	0	0	2	15	1	0	0	0	0	0	0	2	1	7	0	0	0
Tigeciclina	0	0	9	2	0	2	0	0	0	0	1	2	3	0	0	0	0
Tobramycin	0	0	11	2	18	0	0	0	0	0	0	13	1	84	0	0	0

2.1.2.2 Distribuição das CIMs dos Carbapenens

Como o interesse deste trabalho é no estudo da KPC foram seleccionadas para análise as CIMs dos antimicrobianos da família dos Carbapenens: Ertapenem, Imipenem e Meropenem, presentes nos gradientes de concentração das 3 enterobactérias supracitadas. A distribuição das CIMs podem ser observadas nas Tabelas 9, 10 e 11.

Tabela 9 – Distribuição das CIMs dos Carbapenens frente à *Enterobacter* spp.

	<i>Enterobacter</i> spp.									
	Culturas Clínicas				Culturas de Vigilância					
	1	2	4	8	0.25	0.5	1	2	4	8
Ertapenem	7	5	6	0	1	2	3	7	68	0
Imipenem	0	11	0	1	0	0	37	8	12	21
Meropenem	0	2	1	0	0	0	35	3	11	16

Tabela 10 – Distribuição das CIMs dos Carbapenens frente à *Escherichia coli*

	<i>Escherichia coli</i>														
	Culturas Clínicas									Culturas de Vigilância					
	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	0.25	0.5	1	2	4	8
Ertapenem	3	402	10	4	12	0	0	0	2	1	0	0	0	23	0
Imipenem	0	0	579	10	9	5	0	0	0	0	0	19	4	0	3
Meropenem	0	0	587	7	2	10	0	0	0	0	0	14	1	1	6

Tabela 11 – Distribuição das CIMs dos Carbapenems frente à *Klebsiella* spp.

	<i>Klebsiella</i> spp.									
	Culturas Clínicas				Culturas de Vigilância					
	1	2	4	8	0.5	1	2	4	8	
Ertapenem	8	4	10	0	2	0	7	196	0	
Imipenem	22	2	7	0	0	55	36	25	44	
Meropenem	23	4	1	2	0	27	12	36	111	

- *Enterobacter* sp.:

- Ertapenem: 87 isolados, 50 são censurados à direita, 3 censurados à esquerda e 34 censurados intervalarmente.
- Imipenem: 83 isolados, 12 são censurados à direita, 36 censurados à esquerda e 35 censurados intervalarmente.
- Meropenem: 61 isolados, 12 são censurados à direita, 30 censurados à esquerda e 19 censurados intervalarmente.

- *Escherichia coli*:

- Ertapenem: 148 isolados, 18 são censurados à direita, 126 censurados à esquerda e 4 censurados intervalarmente.
- Imipenem: 156 isolados, 3 são censurados à direita, 150 censurados à esquerda e 9 censurados intervalarmente.
- Meropenem: 154 isolados, 1 foi censurados à direita, 146 censurados à esquerda e 7 censurados intervalarmente.

- *Klebsiella* sp.:

- Ertapenem: 204 isolados, dos quais 170 são censurados à direita, 1 censurado à esquerda e 33 censurados intervalarmente.
- Imipenem: 155 isolados, dos quais 23 são censurados à direita, 52 censurados à esquerda e 80 censurados intervalarmente.
- Meropenem: 178 isolados, dos quais 45 são censurados à direita, 25 censurados à esquerda e 108 censurados intervalarmente.

As análises destas combinações bactéria/antimicrobiano estão bem detalhadas no Capítulo 4.

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DA TENDÊNCIA TEMPORAL EM ISOLADOS DE *Staphylococcus* SPP.

Resumo

A concentração inibitória mínima é a menor concentração de um antimicrobiano capaz de inibir o crescimento visível do micro-organismo. Esta pode ser tratada em seu formato quantitativo original ou como resultados binários, após a dicotomização baseada em valores de corte epidemiológicos. Estes resultados binários determinam se um isolado é “resistente” ou “suscetível” a um determinado antimicrobiano. A proposta deste trabalho é avaliar a tendência temporal na resistência bacteriana para dados de concentração inibitória mínima dicotomizados. Foram utilizados resultados de testes de suscetibilidade antimicrobiana em combinações bactéria/agentes antimicrobianos, reportados como a proporção de isolados resistentes por combinação. Os pontos de corte epidemiológicos utilizados, foram os determinados pelo Clinical and Laboratorial Standards Institute. As tendências temporais na resistência da bactéria *Staphylococcus* spp., obtidas de isolados coletados no Hospital Universitário de Maringá, entre os anos de 2011 e 2016, foram verificadas utilizando o teste de Cochran-Armitage e Regressão Logística. As análises evidenciam, em ambos os testes, uma diminuição significativa na tendência da resistência bacteriana para os antimicrobianos Clindamicina, Oxacilina, Rifampicina e Tetraciclina. E ainda foi possível observar que o uso de um modelo de Regressão Logística é mais indicado neste tipo de análise, pois fornece informações adicionais sobre a tendência temporal.

Palavras-chaves: Concentração Inibitória Mínima, Testes de Tendência de Cochran-Armitage, Regressão Logística.

Abstract

The minimum inhibitory concentration is the lowest concentration of an antimicrobial capable of inhibiting the visible growth of the microorganism. This can be treated in its original quantitative format or as binary results, after dichotomization based on epidemiological cut-off values. These binary results determine whether an isolate is "resistant" or "susceptible" to a given antimicrobial. The purpose of this work is to evaluate the temporal trend in bacterial resistance for dichotomized minimum inhibitory concentration data. Results of antimicrobial susceptibility tests were used in combinations of bacteria / antimicrobial agents, reported as the proportion of resistant isolates by combination. The epidemiological cutoff points used were those determined by the Clinical & Laboratory Standards Institute. The temporal trends in resistance of *Staphylococcus spp.* Bacteria obtained from isolates collected at the University Hospital of Maringá between 2011 and 2016 were verified using the Cochran-Armitage and Logistic Regression test. In both tests, the analyzes showed a significant decrease in the tendency of bacterial resistance to antimicrobials Clindamycin, Oxacillin, Rifampicin and Tetracycline. It was also possible to observe that the use of a Logistic Regression model is more indicated in this type of analysis because it provides additional information about the temporal trend.

Palavras-chaves: Minimum Inhibitory Concentration; Cochran-Armitage Trend Tests; Logistic Regression.

3.1 Introdução

Madigan, Martinko e Parker (2003) afirmam que a descoberta e o uso clínico de muitos antibióticos conhecidos têm sido concomitantes ao surgimento de bactérias resistentes. Estes mutantes resistentes associados à grande capacidade de recombinação da bactéria tem levado ao surgimento de bactérias multirresistentes, que segundo Levy et al. (2004) são as responsáveis pela alta incidência de IRAS, Infecções Relacionadas ao Serviço de Saúde. Jaspers, Aerts e Verbeke (2013) afirmam que as bactérias multirresistentes são um dos principais fardos da saúde pública das últimas décadas, e por isso, é extremamente importante estudar e monitorar o surgimento de isolados com suscetibilidade reduzida.

O monitoramento da resistência antimicrobiana é um processo de coleta, análise e relato de dados, específico e contínuo, que, entre outros, visa identificar tendências temporais na ocorrência de resistência a antimicrobianos (AERTS; FAES; NYSEN, 2011). De acordo com estes autores, o objetivo mais geral da análise de tendências da resistência antimicrobiana é verificar se o nível de resistência aumentou ou diminuiu ao longo do tempo. E ainda, se tiver aumentado ou diminuído, com que rapidez ou lentidão isto ocorreu.

Os testes de suscetibilidade *in vitro* são utilizados para determinar as concentrações de um agente antimicrobiano que impede o crescimento das bactérias de interesse (CORTINHAS

et al., 2013). A avaliação correta das suscetibilidades bacterianas a antibióticos é necessária para uma terapêutica empírica ou dirigida adequada (FERREIRA, 2014).

Cortinhas et al. (2013) afirmam que a determinação da CIM é uma importante ferramenta para estudar e comparar a suscetibilidade antimicrobiana de microrganismos contra novas drogas e para monitorar mudanças na resistência ao longo do tempo.

O método de detecção da CIM utilizado no Hospital Universitário Regional de Maringá (HUM) é o Sistema Automatizado *Phoenix BD*. Este sistema utiliza o “Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos” (TSA), *BD PhoenixTM*, que consiste num teste de microdiluição em caldos com concentrações crescentes de diversos antimicrobianos e a CIM de cada um é definida pelo primeiro recipiente que não apresenta turbidez. Segundo Peloso (2011), os sistemas automatizados, como este apresentado, fornecem as CIMs aproximadas através de testes com 2 a 5 diluições de cada antimicrobiano.

O HUM é um hospital de ensino vinculado à Universidade Estadual de Maringá. Ele possui 123 leitos em atividade para internações em enfermaria, UTIs pediátrica, adulta e neonatal e pronto-atendimento. Neste hospital a coleta de culturas de vigilância foi instituída em 2011 juntamente com o desenvolvimento do projeto “Vigilância Epidemiológica de Bactérias Multirresistentes no Hospital Universitário Regional de Maringá” (ZARPELLON, 2015). Os dados avaliados neste trabalho são provenientes deste projeto.

Ferreira (2014) afirma que a realização de testes de suscetibilidade aos antimicrobianos é tarefa diária nos laboratórios clínicos mundiais de microbiologia. De acordo com esta autora, tradicionalmente as bases clínicas para os TSAs categorizam a possibilidade de sucesso clínico em suscetível (S), intermediário (I) e resistente (R). No entanto, segundo Hombach, Bloemberg e Böttger (2011) os critérios de interpretação clínicos podem variar de acordo com o órgão seguido: CLSI, EUCAST ou comitês nacionais.

Os Critérios Interpretativos determinados pelo CLSI (2016) são os valores de CIM utilizados para indicar os pontos de interrupção. “Suscetíveis” (S) são os isolados inibidos pelas concentrações das dosagens recomendadas do agente antimicrobiano, para tratar o local da infecção, resultando em eficácia clínica provável. Os “intermediários” (I) incluem isolados cujas CIMs do agente antimicrobiano apresentam taxas de resposta menores do que para os isolados suscetíveis, no sangue e nos tecidos, mas em locais onde os fármacos são fisiologicamente concentrados (por exemplo, quinolonas e β -lactâmicos na urina) apresentam eficácia na mesma concentração. E os isolados “resistentes” (R) não são inibidos pelas concentrações usualmente possíveis do agente antimicrobiano e a eficácia clínica do agente contra o isolado não foi demonstrada de forma confiável em estudos de tratamento.

A CIM pode ser utilizada para determinar a proporção de isolados resistentes dentre o número total de isolados testados para cada agente antimicrobiano. Representados desta forma, Aerts, Faes e Nysen (2011) afirmam que a tendência temporal em dados qualitativos

pode ser examinada pelo teste de tendência de Cochran-Armitage (COCHRAN, 1954; ARMITAGE, 1955), que é baseado numa regressão linear ponderada das proporções binomiais nos escores dos níveis da variável explicativa. Este teste é equivalente ao teste Cochran-Mantel-Haenszel para uma correlação não-zero. A tendência também pode ser testada dentro de um modelo de Regressão Logística.

A bactéria selecionada para aplicação destes métodos supracitados é a *Staphylococcus* spp.. Segundo Gomes (2013) a espécie *aureus* é a espécie típica e principal patógeno dentre as espécies do gênero. Santos et al. (2007) afirmam que o *Staphylococcus aureus* é uma bactéria do grupo dos cocos gram-positivos que faz parte da microbiota humana, mas que pode provocar doenças que vão desde uma infecção simples, como espinhas e furúnculos, até as mais graves, como pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico e septicemia, entre outras. Essa bactéria foi uma das primeiras a serem controladas com a descoberta dos antibióticos, mas, devido a sua enorme capacidade de adaptação e resistência, tornou-se uma das espécies de maior importância no quadro das infecções hospitalares e comunitárias.

3.2 Metodologia

Neste trabalho os critérios de interpretação adotados são os fornecidos pelo *Clinical & Laboratorial Standards Institute* (CLSI, 2016). Este órgão publica anualmente um documento atualizado com os valores de CIM que devem ser adotados como pontos de corte (*breakpoints*) para todas as bactérias. Os dados analisados foram coletados entre os anos de 2011 e 2016, portanto, os valores de corte considerados foram os determinados pelo CLSI para os respectivos anos, (CLSI, 2011; CLSI, 2012; CLSI, 2013; CLSI, 2014; CLSI, 2015; CLSI, 2016).

Este órgão categoriza os os critérios de interpretação em R, I e S, mas neste trabalho os dados são dicotomizados em S e R, para isto os isolados interpretados inicialmente como I, são reclassificados como R por estarem acima do limiar de suscetibilidade. Este foi o mesmo critério adotado por Aerts, Faes e Nysen (2011).

Além de determinar os critérios interpretativos, o CLSI classifica os antimicrobianos em grupos de opção de tratamento. Os que pertencem ao grupo A são as primeiras opções de tratamento, ao B segunda e ao C terceira. E ainda, os U são os antibióticos para o tratamento da bactéria no trato urinário e O são os ministrados associados a outros antimicrobianos. Neste trabalho foram selecionados os antimicrobianos classificados como primeira ou segunda opção de tratamento, para avaliar se houve aumento da resistência.

A tendência temporal em dados com variável resposta dicotômica pode ser avaliada pelo Teste de Tendência de Cochran-Armitage e por um modelo de Regressão Logística, ambos implementados nos pacotes PROC FREQ e PROC LOGISTIC (STUDIO, 2015) respectivamente.

3.2.1 Teste de Tendência de Cochran-Armitage

O teste Cochran-Armitage testa a tendência nas proporções binomiais nos níveis de uma variável (SAS, 2010). É uma modificação do teste chi-quadrado de Pearson para incorporar uma suspeita de ordenação nos efeitos das i categorias da segunda variável. Este teste é apropriado para uma tabela de dupla entrada onde a variável resposta tem dois níveis, ou seja, é dicotômica, e a variável explicativa é ordinal. Os dados são resumidos da seguinte forma

	B_1	B_2	B_3	
A_1	$R_0(p_{10})$	$R_1(p_{11})$	$R_2(p_{12})$	$R(p_{1.})$
A_2	$S_0(p_{20})$	$S_1(p_{21})$	$S_2(p_{22})$	$S(p_{2.})$
	$N_0(p_{.0})$	$N_1(p_{.1})$	$N_2(p_{.2})$	N

em que A_1 representa a proporção de isolados resistentes e A_2 a proporção de isolados suscetíveis. B_1, B_2, B_3 representam os anos, ordenados. Cada uma das entradas representa a proporção de isolados resistentes ou suscetíveis por ano.

Se a variável resposta tem dois níveis e está disposta nas linhas e a covariável tem i colunas, o PROC FREQ (SAS, 2010) testa a tendência em todos os níveis das colunas e a proporção binomial é calculada como a proporção de observações na primeira linha. Para esta disposição a estatística de teste é calculada como

$$T_{CA} = \frac{\sum_{i=1}^R N_i(R_i - \bar{R})}{\sqrt{p_{1.}(1 - p_{1.})s^2}} \quad (3.1)$$

em que, R_i é o total da coluna i ; N_i é o total da coluna i ; \bar{R} é a média dos escores e $s^2 = \sum_{i=1}^R N_i(R_i - \bar{R})^2$.

A Hipótese Nula (H_0) deste teste é que não há tendência, o que significa que a proporção binomial é a mesma para todos os níveis da variável explicativa. Sob H_0 a estatística do teste é assintoticamente normal.

3.2.2 Regressão Logística

Segundo Aerts, Faes e Nysen (2011), num modelo de Regressão Logística, o ponto de partida da inferência sobre a resistência antimicrobiana é a distribuição binomial representada por

$$y_{ij} \sim B(n_{ij}, \pi_{ij}) \quad (3.2)$$

em que: y_{ij} é o número de isolados resistentes ao antimicrobiano i , no tempo t_j ; n_{ij} é o número de isolados testados para o antimicrobiano i , no tempo t_j e π_{ij} a probabilidade de um isolado ser resistente ao antimicrobiano i no tempo t_j .

Segundo [Montgomery e Peck \(1992\)](#), a função resposta logística pode ser facilmente linearizada em função da média da resposta, representada por $E(y_j) = \pi_j = \mathbf{x}'\beta$.

Para vincular a resistência a uma tendência temporal considera-se uma função de ligação $g(\cdot)$. Muitas funções de ligação podem ser usadas, neste trabalho é usada a ligação *logit*, definida como o logaritmo das chances de um isolado ser resistente ao antimicrobiano. É representada por:

$$g(\pi_{ij}) = \text{logit}(\pi_{ij}) = \log\left(\frac{\pi_{ij}}{1 - \pi_{ij}}\right) = \beta_0 + \beta_1 t. \quad (3.3)$$

A razão $\frac{\pi_{ij}}{1 - \pi_{ij}}$ na transformação *logit* é chamada de *Odds* (Chance), que é definida pela probabilidade de sucesso/probabilidade do fracasso, que neste trabalho é a probabilidade de ser resistente/probabilidade de ser suscetível.

Os parâmetros β_0 e β_1 são estimados a partir dos dados, pelo Método de Máxima Verossimilhança (MMV), que segundo [Hosmer, Lemeshow e Sturdivant \(2013\)](#) maximiza a probabilidade daquela amostra ter sido observada. De acordo com [Montgomery e Peck \(1992\)](#), cada observação da amostra assume o valor 0 ou 1 e segue uma distribuição de Bernoulli, com função de probabilidade dada por $f(y_j) = \pi_j^{y_j} (1 - \pi_j)^{1 - y_j}$. Como as observações são independentes, a função de log verossimilhança é dada por $l(y_j, \beta) = \sum_{j=1}^n y_j X_j' \beta - \sum_{j=1}^n \ln[1 + \exp(X_j' \beta)]$. Métodos numéricos são usados para calcular os Estimadores Máxima Verossimilhança (EMV) $\hat{\beta}$.

Ainda de acordo com estes autores, a interpretação dos parâmetros de um modelo de Regressão Logística é obtida comparando a probabilidade de sucesso com a probabilidade de fracasso, usando a *Odds Ratio* (OR), razão de chances, que é obtida a partir da chance. Se a chance é definida por

$$g(t_j) = \frac{\pi(t_j)}{1 - \pi(t_j)} = \frac{\frac{e^{\beta_0 + \beta_1 t_j}}{1 + e^{\beta_0 + \beta_1 t_j}}}{1 - \frac{e^{\beta_0 + \beta_1 t_j}}{1 + e^{\beta_0 + \beta_1 t_j}}} = e^{\beta_0 + \beta_1 t_j} \quad (3.4)$$

Ao tomar dois anos consecutivos, t_j e t_{j+1} , a diferença $t_{j+1} - t_j = 1$ obtém-se

$$OR = \frac{g(t_{j+1})}{g(t_j)} = \frac{e^{\beta_0 + \beta_1 t_{j+1}}}{e^{\beta_0 + \beta_1 t_j}} = e^{\beta_1}. \quad (3.5)$$

Assim, se $\beta_1 > 0 \implies OR > 1 \implies \pi(t_{j+1}) > \pi(t_j)$ e se $\beta_1 < 0 \implies OR < 1 \implies \pi(t_{j+1}) < \pi(t_j)$, ou seja, se $OR < 1$ indica que a probabilidade dos isolados serem resistentes diminui com o passar dos anos, já se $OR > 1$ indica que a probabilidade dos isolados serem resistentes aumenta com o passar dos anos.

Uma outra forma de interpretar estes parâmetros, segundo Aerts, Faes e Nysen (2011) é em função da prevalência. A prevalência é definida como a chance, que é a probabilidade de sucesso/probabilidade do fracasso. A OR fornece a razão de chances $OR = \frac{\frac{\pi_{j+1}}{1-\pi_{j+1}}}{\frac{\pi_j}{1-\pi_j}} = e^{\beta_1}$. Isso pode ser escrito como $\frac{\pi_{j+1}}{1-\pi_{j+1}} = e^{\beta_1} \frac{\pi_j}{1-\pi_j}$. A interpretação disto é que e^{β_1} é igual o aumento (ou diminuição se for menor do que 1) na prevalência da resistência quando o tempo aumenta 1 (um) ano.

3.3 Aplicação

Nesta seção as metodologias para avaliação da tendência temporal são aplicadas em dados de CIM de isolados de *Staphylococcus* spp, coletados no HUM/UEM entre os anos 2011 e 2016.

Os antimicrobianos avaliados podem ser observados na Tabela 12, que apresenta o grupo do antimicrobiano e a proporção de isolados resistentes durante os seis anos avaliados. Como pode-se observar, três são primeira opção de tratamento (A) e dois segunda (B).

Tabela 12 – Identificação dos grupos e Proporção de isolados resistentes a cada um dos antimicrobianos avaliados no HUM/UEM, 2011-2016.

Antibiótico	Grupo	Proporção de Resistentes
Clindamicina	A	47,85
Eritromicina	A	63,36
Oxacilina	A	49,36
Rifampicina	B	06,22
Tetraciclina	B	13,25

As análises avaliam se há aumento ou diminuição na proporção de isolados resistentes por ano, para detectar se existe tendência significativa. Isto pode ser observado em tabelas como as 13 e 14 que representam respectivamente, a distribuição da CIM por ano e a proporção de isolados resistentes por ano para a bactéria *Staphylococcus* ssp, testada para o antimicrobiano Eritromicina.

Tabela 13 – Distribuição da CIM de *Staphylococcus* ssp. isolados de pacientes internados no HUM/UEM, testados para suscetibilidade contra Eritromicina, 2011-2016.

Ano	0.25	0.5	1	2	4
2011	0	70	2	0	122
2012	0	87	4	1	127
2013	0	48	0	1	99
2014	0	38	0	0	85
2015	0	36	3	1	47
2016	0	17	1	0	22

Tabela 14 – Proporção de isolados de *Staphylococcus ssp.* resistentes ao antimicrobiano Eritromicina, 2011-2016.

Antibiótico	Suscetíveis (S)	Resistentes (R)	R (%)
	CIM \leq 0.5 mg/L	CIM \geq 4 mg/L	
2011	70	122	62,89
2012	87	127	57,99
2013	48	99	66,89
2014	38	85	69,11
2015	36	47	54,02
2016	17	22	55,00

Na Tabela 14 os valores observados menores ou iguais aos *breakpoints* são definidos como S e maiores são R. Nesta tabela são apresentadas a porcentagem de isolados R para cada ano observado.

Uma representação gráfica é apresentada na Figura 1. Pontos mais largos correspondem a maiores proporções de isolados com esta CIM. As proporções são calculadas para cada ano e os valores estão dicotomizados em suscetíveis ou resistentes. Os *breakpoints* estão representados pelas linhas vermelhas. Nesta figura observa-se também os isolados de Penicilina, para verificar que ao longo dos anos todos os isolados estão acima do limiar de suscetibilidade.

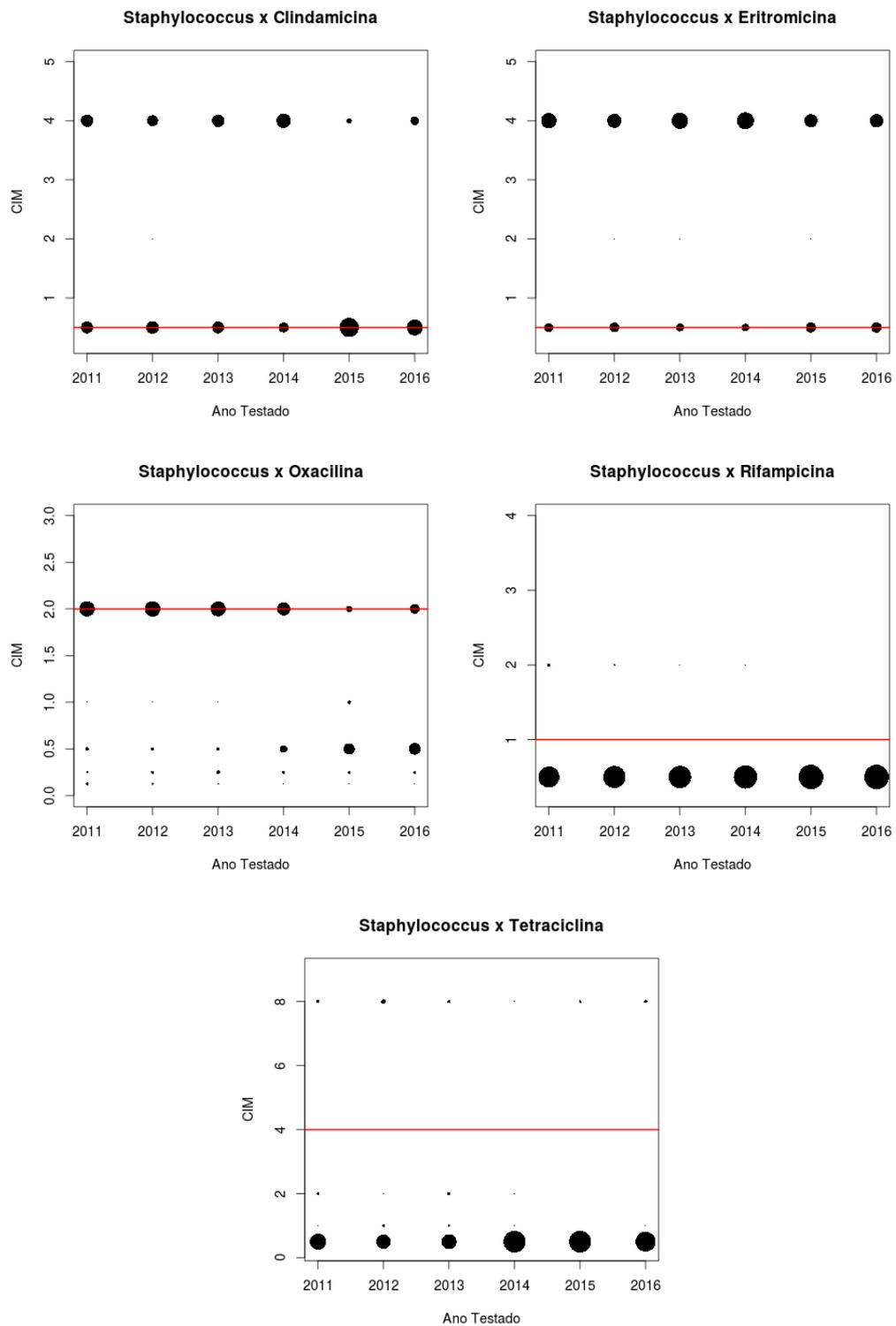


Figura 5 – Proporção de isolados suscetíveis e resistentes aos 5 antimicrobianos avaliados entre 2011 e 2016. A linha vermelha representa o limiar de suscetibilidade, acima dela os isolados são definidos como resistentes. O tamanho dos círculos pretos representa a proporção de isolados, quanto maiores, maior proporção de isolados com aquela CIM.

3.3.1 Resultados Testes de Tendência

Foi aplicado, nos cinco antimicrobianos selecionados, o teste de tendência de Cochran-Armitage e foram obtidos os resultados observados na Tabela 15.

Tabela 15 – Testes de Tendência de Cochran-Armitage.

Antibiótico	Estatística T_{CA}	valor p unilateral	valor p bilateral
Clindamicina	-2.0072	0.0224	0.0447
Eritromicina	-0.1269	0.4495	0.8990
Oxacilina	-5.8444	<.0001	<.0001
Rifampicina	4.8688	<.0001	<.0001
Tetraciclina	2.1404	0.0162	0.0323

No teste de Cochran-Armitage a hipótese nula é que não há tendência temporal. Com um nível de significância de 5% pode-se observar uma forte rejeição da hipótese nula para os antimicrobianos Oxacilina e Rifampicina com um valor $p < .0001$. E ainda observa-se rejeição para Clindamicina e Tetraciclina, com valor p 0.0449 e 0.0324 respectivamente.

As estimativas dos parâmetros de um modelo de Regressão Logística, seus respectivos erros padrão e valor p , estão apresentadas na Tabela 16, para os cinco antimicrobianos avaliados. Pode-se observar que as estimativas do parâmetro β_1 são estatisticamente significativas para os mesmos quatro antimicrobianos, observados no Teste de Cochran-Armitage, apresentando a mesma forte rejeição para Oxacilina e Rifampicina, valor $p < .0001$, e 0.0452 para Clindamicina e 0.0332 para Tetraciclina.

Tabela 16 – Estimativas dos Parâmetros do Modelo

Antibiótico	$\hat{\beta}_1$	Erro Padrão	χ^2 Wald	valor p	\hat{OR}	IC Wald(95%)
Clindamicina	-0.1076	0.0537	4.0096	0.0452	0.898	(0.808; 0.998)
Eritromicina	-0.0062	0.049	0.0161	0.8989	0.994	(0.903; 1.094)
Oxacilina	-0.2782	0.0483	33.1136	<.0001	0.757	(0.689; 0.832)
Rifampicina	-0.6073	0.132	21.1590	<.0001	0.545	(0.421; 0.706)
Tetraciclina	-0.1552	0.073	4.5375	0.0332	0.856	(0.742; 0.988)

As estimativas para a OR, definida por e^{β_1} , também estão apresentadas na Tabela 16, juntamente com seus respectivos Intervalos com 95% de Confiança. Pode-se observar que o único IC que contém o 1 (um) é o da Eritromicina. Os outros quatro antimicrobianos não o contêm, indicando que as estimativas são estatisticamente diferente de um. Para os outros quatro antimicrobianos pode-se observar que a OR estimada é menor do que 1: para Clindamicina é 0,898, Oxacilina é 0,757, Rifampicina é 0,545 e Tetraciclina 0,856. Isto indica que a prevalência dos isolados resistentes está diminuindo com o passar dos anos.

A interpretação em termos de prevalência, como observado em [Aerts, Faes e Nysen \(2011\)](#), segue da seguinte forma: para Clindamicina a chance dos isolados serem resistentes em cada ano subsequente diminui em média 0,898 do ano anterior. Para Oxacilina diminui 0,757, para Rifampicina: 0,545 e para Tetraciclina: 0,856.

3.4 Discussão

O presente trabalho permitiu a avaliação da utilização de testes para tendência temporal na resistência bacteriana: o teste de tendência de Cochran-Armitage e o modelo de Regressão Logística, com função de ligação *logit*, ambos aplicados quando a variável resposta é dicotômica.

Os dados de CIM de isolados de *Staphylococcus* spp., coletados de pacientes internados no HUM/UEM, foram dicotomizados em R e S, utilizando os critérios fornecidos pelo CLSI, e a proporção de isolados resistentes observados ao longo dos anos foi avaliada para verificar se houve tendência de aumento ou diminuição da resistência.

[Aerts, Faes e Nysen \(2011\)](#) afirmam que os testes de tendência avaliam se flutuações ao longo do tempo podem ser consideradas como aleatórias, ou se estão relacionadas a mudanças estruturais maiores que causariam mudanças de tendência gradual ou pontos de mudança bastante bruscos. No presente estudo, quando a covariável “ano” é adicionada ao modelo é avaliado se as mudanças na variável resposta “proporção de isolados resistentes” sofrem estas mudanças bruscas com o passar do tempo, ou seja, se estas variáveis estão relacionadas.

De acordo com [Rollo \(2011\)](#) a característica mais atraente da abordagem dicotômica é a sua simplicidade. A escala binária classifica claramente os isolados em R ou S. Isso propicia uma robustez nas classificações. Além disso a avaliação da tendência é simples de se realizar com teste de Cochran-Armitage ou um modelo de Regressão Logística.

No teste de tendência de Cochran-Armitage a hipótese nula testada é que não há tendência ([STUDIO, 2012](#)), quando esta hipótese é rejeitada verifica-se a existência de tendência, mas segundo [Aerts, Faes e Nysen \(2011\)](#), não é possível verificar se esta indica aumento ou diminuição da proporção de isolados resistentes. Para verificar isto e quantificar este aumento ou diminuição, utiliza-se o modelo de Regressão Logística, que fornece alguns recursos adicionais.

Os parâmetros β_0 e β_1 de um modelo de Regressão Logística são estimados por máxima verossimilhança ([MONTGOMERY; PECK; VINING, 2012](#); [HOSMER; LEMESHOW; STURDIVANT, 2013](#); [AGRESTI, 2013](#)). São determinados os coeficientes $\hat{\beta}_0$ e $\hat{\beta}_1$ que fazem com que os resultados observados na amostra sejam os mais verossímeis. Como este é um modelo não linear, a estimativa dos parâmetros é realizada por métodos iterativos.

Segundo [Aerts, Faes e Nysen \(2011\)](#), a interpretação de β_1 se refere ao impacto da variação unitária na covariável (1 ano) no logaritmo natural da razão entre a probabilidade de

sucesso e a probabilidade de fracasso. Em termos práticos esta interpretação não apresenta grande valia. Mas como observado em [Hosmer, Lemeshow e Sturdivant \(2013\)](#), quando este parâmetro é tomado na forma e^{β_1} , fornece a estimativa da OR. Esta, por sua vez, como explicado por [Aerts, Faes e Nysen \(2011\)](#), fornece a prevalência de isolados resistentes ao longo dos anos observados. Se a $OR < 1$, como observada nos resultados deste trabalho, indica que houve uma redução na prevalência de isolados resistentes nos anos observados.

Um estudo aprofundado do microorganismo *Staphylococcus* spp. e sua relação com os antimicrobianos avaliados se faz necessário para entender o motivo pelo qual os resultados obtidos neste trabalho não acompanharam a tendência mundial de aumento na resistência bacteriana. Esta análise fica como proposta de um estudo futuro.

Comparando as duas abordagens apresentadas, é possível verificar que os recursos adicionais fornecidos pelo ajuste de um modelo de Regressão Logística, com função de ligação *logit*, são extremamente favoráveis ao uso desta metodologia.

Algumas limitações destas duas abordagens, destacadas por [Aerts, Faes e Nysen \(2011\)](#), [Rollo \(2011\)](#), devem ser ressaltadas: a primeira é a determinação do ponto de corte clínico utilizado. Existem outros órgãos e comitês internacionais que também determinam estes pontos de corte, além do CLSI, como o EUCAST. Isto significa que estes valores não são unificados internacionalmente, o que pode gerar diferenças entre trabalhos deste tipo.

A segunda limitação é a mudança nos valores dos limiares que podem ocorrer. Por exemplo, o CLSI publica anualmente os pontos de corte que devem ser seguidos, para algumas combinações bactéria/antimicrobiano acontece de haver mudanças bruscas. Nos cinco antimicrobianos avaliados não houve nenhuma mudança nos seis anos observados.

Uma última limitação que deve ser considerada é que ao dicotomizar uma escala completa de CIM, ocorre perda de informação. Tendências que ocorrem abaixo ou acima do *break-point* não são detectadas. E em alguns casos pode ser relevante detectar essa tendência tão cedo quanto possível. Nestes casos é aconselhável o uso de modelos que consideram a escala completa da CIM, como será tratado no capítulo seguinte.

CAPÍTULO 4

APLICAÇÕES DE ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA EM DADOS DE CIM DE ENTEROBACTÉRIAS

Resumo

Na rotina laboratorial, quando se deseja definir a atividade de um agente antimicrobiano diante de um determinado microorganismo, utiliza-se a concentração Inibitória Mínima (CIM), que é a menor concentração de um antimicrobiano capaz de inibir o crescimento visível do microorganismo. É razoável assumir que o verdadeiro valor da CIM está entre a última diluição/concentração que não inibe esse crescimento e a primeira que o inibe. Esta particularidade associada ao valor observado da CIM caracteriza o que é conhecido, em Análise de Sobrevivência, como resposta censurada intervalarmente. Neste trabalho são comparadas as distribuições das CIMs das estirpes de enterobactérias *Klebsiela spp.*, *Escherichia coli* e *Enterobacter spp.*, obtidas pelos métodos de vigilância e de cultura clínica, isoladas no HU/UEM/Maringá entre os anos de 2012 e 2016. As comparações foram realizadas a partir dos resultados provenientes dos ajustes de modelos de regressão na presença de respostas censuradas. As análises evidenciam um aumento significativo da resistência bacteriana, ao longo dos anos observados, para as combinações: *Escherichia coli*-Ertapenem, *Escherichia coli*-Meropenem e *Klebsiela spp.*-Meropenem. Evidenciam também que a média da CIM do Ertapenem é significativamente menor nas culturas clínicas, para as três bactérias.

Palavras-chaves: Análise de sobrevivência, Concentração inibitória mínima, Dados censurados.

Abstract

In the laboratory routine, when it is desired to define the activity of an antimicrobial agent in front of a certain microorganism, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), which is the lowest concentration of an antimicrobial capable of inhibiting the visible growth of the microorganism, is used. It is reasonable to assume that the true value of the MIC is between the last dilution / concentration that does not inhibit this growth and the first that inhibits it. This particularity associated with the observed value of the CIM characterizes what is known, in Survival Analysis, as an interval censored response. In this work, the distributions of MICs of enterobacterial strains *Klebsiella* spp, *Escherichia coli* and *Enterobacter* spp, obtained by surveillance and clinical culture methods, isolated in HU / UEM / Maringá between the years of 2012 and 2016 are compared. The comparisons were made from the results of the adjustments of regression models in the presence of censored answers. The analyzes showed a significant increase in bacterial resistance over the years observed for the combinations: *Escherichia coli*-Ertapenem, *Escherichia coli*-Meropenem and *Klebsiella* spp-Meropenem. They also show that the mean MIC of Ertapenem is significantly lower in clinical cultures for all three bacteria.

Keywords: Survival analysis, Minimal inhibitory concentration, Censored data.

4.1 Introdução

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) é definida como a menor concentração de uma substância antimicrobiana que inibe o crescimento visível de um microorganismo (JASPERS; AERTS; VERBEKE, 2013; REINSTEIN et al., 2009). A determinação da CIM é fundamental para avaliar a suscetibilidade antimicrobiana de isolados de bactérias (AERTS; FAES; NYSEN, 2011). Seu valor é estabelecido a partir de ensaios de diluição (LEE; WHITMORE, 1999) que se caracterizam pela exposição de um isolado bacteriano a concentrações crescentes de antimicrobianos. Em outras palavras, a determinação da CIM é obtida a partir da constatação da sobrevivência dos isolados nos gradientes de concentrações (ROLLO, 2011).

A CIM para carbapenens é utilizada como triagem para verificar a presença de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em isolados de enterobactérias obtidas em culturas de vigilância. De acordo com Paula et al. (2016), estas culturas consistem na coleta, por *swab* retal, de amostras de pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI), para verificar se dentre as bactérias que estão colonizando estes pacientes há a presença de KPC, uma enzima que confere resistência aos Carbapenens. Segundo Possebon e Camargo (2003), Dienstmann et al. (2010) e He et al. (2015), os Carbapenens são muitas vezes o último recurso para o tratamento de infecções causadas por bactérias multirresistentes.

A enzima KPC foi encontrada pela primeira vez em 1996 nos Estados Unidos em isolados de *Klebsiella pneumoniae*, dando origem ao seu nome *Klebsiella pneumoniae* produtora

Carbapenemase (KPC) (SHENG et al., 2010; OLIVEIRA; STRANIERI, 2011). De acordo com estes autores, esta enzima também pode ser produzida por outras enterobactérias (bactérias da microbiota intestinal) como *Enterobacter spp.*, *Escherichia coli*, *Salmonella sp.*, *Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp.*.

Dienstmann et al. (2010) afirmam que a produção de KPC é um mecanismo emergente na família das *Enterobacteriaceae*, o que justifica sua vigilância constante. A pesquisa desta enzima é relevante para limitar sua disseminação, contribuindo para a redução dos índices de morbidade e mortalidade ligados a diferentes doenças infecciosas, em que é imprescindível a vigilância microbiológica, juntamente com ação da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH).

No Brasil, para tentar controlar este grave problema clínico e epidemiológico nas diversas instituições de saúde, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabeleceu um sistema de monitoramento. Na Nota Técnica Nº 01/2013 (BRASIL, 2013), foi instituído que além dos microrganismos isolados de materiais clínicos, podem ser obtidas culturas de vigilância para monitorar o aparecimento de bactérias multirresistentes. Neste documento a ANVISA preconiza que cabe à Comissão de Controle de Infecções Hospitalares (CCIH) avaliar a necessidade de implantar a coleta de culturas de vigilância de acordo com o perfil epidemiológico da instituição.

No Hospital Universitário Regional de Maringá (HUM), a coleta de culturas de vigilância e a identificação de isolados dentro do HUM, foi instituída em 2011 juntamente com o desenvolvimento do projeto “Vigilância Epidemiológica de Bactérias Multirresistentes no Hospital Universitário Regional de Maringá”. O HUM é um hospital de ensino vinculado à Universidade Estadual de Maringá, na cidade de Maringá no Paraná. Ele possui 123 leitos em atividade para internações em enfermaria, UTIs pediátrica, adulta e neonatal e pronto-atendimento.

De acordo com Zarpellon (2015), existe a obrigatoriedade das culturas de vigilância nas enterobactérias produtoras de KPC. Estas culturas são realizadas seguindo o protocolo estabelecido pelo HUM, que determina que devem ser realizadas coletas por *swab* retal quinzenalmente em pacientes adultos que permanecem internados. Na triagem de pronto atendimento são coletadas amostras de pacientes que estiveram internados em enfermaria por mais de 48 horas nos últimos 30 dias ou internados em UTI nos últimos 6 meses ou que estiveram em tratamento dialítico.

A importância da análise da CIM dos Carbapenens deve-se ao fato destes pertencerem ao grupo de antimicrobianos denominado beta-lactâmicos. Segundo Azevedo (2014), este grupo se define pela presença do anel beta-lactâmico, que atua inibindo a última etapa da biossíntese da parede celular bacteriana, garantindo uma ampla margem terapêutica e escassa toxicidade ao organismo humano, pois as células procariontes não possuem parede celular.

Ainda de acordo com Azevedo (2014), o uso abusivo e por vezes inapropriado dos antibióticos, em especial dos beta-lactâmicos, modificou em grande escala a ecologia bacteriana,

promovendo o aumento da incidência de estirpes resistentes aos antibióticos.

O método de detecção da CIM utilizado no HUM é o sistema automatizado *Phoenix BD*. Este sistema utiliza o “Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos” (TSA), *BD PhoenixTM*, que consiste num teste de microdiluição em caldos com concentrações crescentes, em geral na forma $\log_2 2^x$ para $x = -3, -2, \dots, 9, 10$ — gerando concentrações de 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512 e 1024 mg/L. A primeira concentração que não é observada turbidez — crescimento — define a CIM.

De acordo com [Wu \(2008\)](#), este processo de detecção da CIM retorna uma resposta censurada à esquerda, intervalarmente ou à direita. Por exemplo, uma CIM de 8 mg/L indica que seu valor real encontra-se entre 4 e 8 mg/L. Devida a esta particularidade, dados de CIM podem ser analisados via procedimentos usuais de Análise de Sobrevivência.

Sob o ponto de vista da Análise de Sobrevivência paramétrica muitos trabalhos na literatura consideram que dados de CIM seguem distribuição Log-Normal. Dentre eles cita-se, sem sermos exaustivos: [Lee e Whitmore \(1999\)](#), [Annis e Craig \(2005\)](#), [Turnidge, Kahlmeter e Kronvall \(2006\)](#), [Wu \(2008\)](#), [Rollo \(2011\)](#), [Aerts, Faes e Nysen \(2011\)](#), [Kasstele et al. \(2012\)](#), [Cortinhas et al. \(2013\)](#). Sob esta suposição tem-se que o logaritmo da CIM é uma variável aleatória normalmente distribuída com média que pode ser dependente de covariáveis.

Nesta direção, neste artigo os dados de CIM são analisados por meio de modelos de regressão, usados para avaliar se existe alguma relação entre a média da CIM e as covariáveis “tipo de cultura” e “ano de coleta”. Seguindo as abordagens utilizadas por [Wu \(2008\)](#), [Annis e Craig \(2005\)](#) e [Kasstele et al. \(2012\)](#), o objetivo principal deste trabalho é ajustar diferentes modelos para avaliar o comportamento da média da variável resposta $Y = \log(\text{CIM})$.

As CIMs avaliadas são resultantes da combinação das enterobactérias das estirpes *Enterobacter* spp., *Escherichia coli* e *Klebsiela* spp., com os antimicrobianos da família dos Carbapenens (Ertapenem, Imipenem e Meropenem).

A importância deste trabalho está em analisar dados da região de Maringá, coletados no HUM, e verificar como está a resistência aos carbapenens, com o uso de Análise de Sobrevivência. Esta metodologia estatística vem se destacando nos últimos anos para análise deste tipo de dados, pois considera os valores da CIM de forma contínua e censurada.

4.2 Metodologia

4.2.1 Análise de Sobrevivência

A análise de sobrevivência é um conjunto de procedimentos estatísticos usados para análise do tempo até a ocorrência de algum evento ([KLEIN; MOESCHBERGER, 2005](#)). A principal característica de dados de sobrevivência é a presença da censura. O evento geralmente

é definido como morte, falha, reincidência de uma doença entre outros. Em dados de CIM o evento diz respeito à primeira concentração observada numa placa de TSA que não apresenta turbidez e a resposta observada é a respectiva CIM. De acordo com Wu (2008), a CIM é uma resposta censurada em um intervalo, à esquerda ou à direita.

Exemplificando, um isolado de uma determinada bactéria é testado num gradiente contendo o antimicrobiano Ceftiofur nas concentrações: 0.125, 0.25, 0.50, 1, 2, 4 e 8 mg/L. Se nas concentrações 2, 4 e 8 houve inibição, a CIM é reportada como 2 mg/L. Este valor indica que na concentração de 2 mg/L houve inibição, mas não na concentração de 1 mg/L. Consequentemente, a verdadeira CIM pode estar entre 1 e 2 mg/L e é censurada intervalarmente. Similarmente, se o valor reportado da CIM é 0.125 mg/L, a menor concentração do gradiente, tudo o que se sabe é que a verdadeira inibição pode ter ocorrido no máximo na concentração 0.125 mg/L, logo a CIM é censurada à esquerda. Por outro lado, se o valor da CIM for maior que 8 mg/L, a maior concentração do gradiente, tem-se a CIM censurada à direita.

Uma vez disponíveis os dados de CIM, e sob as considerações supracitadas, estes podem ser analisados assumindo que os mesmos são observações retiradas de uma população regida por alguma distribuição de probabilidade cujos parâmetros devem ser estimados. Além disso, outros pressupostos são considerados. Neste trabalho segue-se os mesmos adotados por Lee e Whitmore (1999) e Wu (2008) a saber:

1. Os testes são realizados sem erro de medição.
2. Os testes são monotônicos no sentido de que se a inibição for detectada na concentração C , então é detectada em qualquer C' , onde $C' > C$.
3. As CIM têm distribuição Log-Normal.

4.2.2 Função de Sobrevivência para Dados de CIM

A variável resposta CIM pode ser representada pela variável aleatória C , não negativa e contínua, que indica a primeira concentração de cada um dos isolados bacterianos observados que não apresentou turbidez.

Seguindo o pressuposto supracitado, uma variável aleatória contínua com distribuição Log-Normal é caracterizada pela sua função densidade de probabilidade descrita por

$$f(c | \mu, \sigma) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma c} \exp \left[-\frac{1}{2\sigma^2} (\log c - \mu)^2 \right] \quad (4.1)$$

em que $\mu \in \mathbb{R}$ e $\sigma > 0$. O valor esperado desta variável aleatória Log-Normalmente distribuída é $E(C) = \exp(\mu + 0.5\sigma^2)$ enquanto que $Var(C) = \exp(2\mu + \sigma^2)[\exp(\sigma^2) - 1]$.

A partir de (4.1) pode-se verificar que a função de distribuição acumulada $F(c | \mu, \sigma)$, que indica a probabilidade de um isolado ser inibido no máximo até a concentração C é dada por

$$F(c | \mu, \sigma) = \Phi\left(\frac{\log(c) - \mu}{\sigma}\right) \quad (4.2)$$

em que $\Phi(\cdot)$ é a função de distribuição acumulada de uma variável aleatória normal padrão.

É notório que a função de sobrevivência é uma das principais funções probabilísticas para descrever dados de sobrevivência. Tendo como resposta a CIM, a função de sobrevivência caracteriza a probabilidade de um isolado ser inibido em uma concentração maior que c . A partir de (4.2) a função de sobrevivência fica definida por $S(c | \mu, \sigma) = 1 - \Phi\left(\frac{\log(c) - \mu}{\sigma}\right)$.

Uma das características mais importantes da distribuição Log-Normal é sua relação com a distribuição Normal. Se a variável aleatória C tem distribuição Log-Normal, pela transformação $Y = \log(C)$, tem-se que $Y \sim N(\mu, \sigma^2)$.

4.2.3 Modelos

De acordo com a natureza dos dados observados μ e σ podem depender de uma ou mais covariáveis. Neste trabalho tem-se disponíveis as covariáveis o “tipo de cultura” e o “ano”. A média é determinada em função das covariáveis da forma $\mu = \mathbf{X}\beta$, e a estimação dos parâmetros é realizada via método de máxima verossimilhança.

Genericamente para cada isolado observa-se o terno: $(c_L^{(i)}, c_U^{(i)}, \mathbf{x}_i)$, $i = 1, \dots, n$ sendo os parâmetros estimados a partir da função de verossimilhança definida na forma:

$$L(\mu(\mathbf{x}), \sigma | \mathbf{c}_L, \mathbf{c}_U, \mathbf{x}, \delta) = \prod_{i=1}^n F(c_L^{(i)} | \mu(\mathbf{x}), \sigma)^{\delta_L^{(i)}} \times S(c_U^{(i)} | \mu(\mathbf{x}), \sigma)^{\delta_U^{(i)}} \quad (4.3)$$

$$\times \left[F(c_U^{(i)} | \mu(\mathbf{x}), \sigma) - F(c_L^{(i)} | \mu(\mathbf{x}), \sigma) \right]^{\delta_I^{(i)}} \quad (4.4)$$

em que \mathbf{x}_i é o vetor de covariáveis, $\delta_L^{(i)} = 1$ se a CIM é censurada à esquerda ou $\delta_L^{(i)} = 0$ caso contrário; $\delta_U^{(i)} = 1$ se a CIM é censurada à direita ou $\delta_U^{(i)} = 0$ caso contrário e $\delta_I^{(i)} = 1$ se a CIM é censurada intervalarmente ou $\delta_I^{(i)} = 0$ caso contrário.

Para estimação dos parâmetros é necessário uso de métodos numéricos disponíveis em softwares padrões, como SAS(PROC LIFEREG).

4.3 Aplicação

Nesta seção é aplicada a metodologia descrita na Seção 2, em um conjunto de dados de CIM de isolados de *Enterobacter*, *E.coli* e *Klebsiella*, coletados de pacientes internados no

HUM/UEM entre os anos de 2012 e 2016. As CIMs avaliadas são dos Carbapenens: Ertapenem, Imipenem e Meropenem, resultando em 9 combinações bactéria-antimicrobiano.

Os isolados foram obtidos do banco de organismos do HU/UEM/Maringá. Todos foram identificados pelo sistema de microbiologia automatizado *BD-Phoenix* (DIFCO, Becton Dickinson and Company/USA) e foram armazenados a uma temperatura de -20°C . Os isolados foram recuperados em placas de ágar para verificar a pureza da cultura. Estas placas foram incubadas em aerobiose, $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$, por 24 horas. Somente um isolado por paciente foi incluído no estudo. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética envolvendo seres humanos da Universidade Estadual de Maringá (CAAE Nº 318.0.093.000-11).

A distribuição das CIMs é apresentada na Tabela 3. Como pode ser observado, as concentrações nas placas, para os três antimicrobianos, foram 0.25, 0.5, 1, 2, 4, e 8 mg/L. Na Tabela 4 pode-se observar a distribuição de frequências do número de isolados por ano e por tipo de cultura para as 9 combinações. Para as culturas de vigilância as amostras foram coletadas por *swab* retal e para culturas clínicas as amostras foram coletadas por sangue, urina ou secreção.

Tabela 17 – Suscetibilidade *in vitro* para Ertapenem, Imipenem e Meropenem de *Enterobacter* spp., *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp.

Microorganismo	Antibióticos	Tipo de Amostra	Nº de Isolados	Concentrações					
				0.25	0.5	1	2	4	8
<i>Enterobacter</i> spp.	Ertapenem	Clínica	17	-	-	7	5	6	-
		Vigilância	79	1	2	3	7	68	-
	Imipenem	Clínica	12	-	-	-	11	-	1
		Vigilância	77	-	-	37	8	12	21
	Meropenem	Clínica	3	-	-	-	2	1	-
		Vigilância	65	-	-	35	3	11	16
<i>Escherichia coli</i>	Ertapenem	Clínica	274	3	402	10	4	12	-
		Vigilância	24	1	-	-	-	23	-
	Imipenem	Clínica	270	-	-	579	10	9	5
		Vigilância	26	-	-	19	4	-	3
	Meropenem	Clínica	277	-	-	587	7	2	10
		Vigilância	22	-	-	14	1	1	6
<i>Klebsiella</i> spp.	Ertapenem	Clínica	20	3	402	10	4	12	-
		Vigilância	202	1	-	-	-	23	-
	Imipenem	Clínica	6	-	-	579	10	9	5
		Vigilância	158	-	-	19	4	-	3
	Meropenem	Clínica	7	-	-	587	7	2	10
		Vigilância	183	-	-	14	1	1	6

Tabela 18 – Distribuição de frequências do número de isolados por ano e por tipo de cultura para Ertapenem, Imipenem e Meropenem de *Enterobacter ssp.*, *Escherichia coli* e *Klebsiella ssp.*

Antimicrobiano	Amostra Clínica					Amostra de Vigilância				
	2012	2013	2014	2015	2016	2012	2013	2014	2015	2016
	<i>Enterobacter ssp.</i>									
Ertapenem	2	3	6	4	2	6	9	19	19	26
Imipenem	-	2	1	3	6	7	9	22	17	22
Meropenem	-	1	-	1	1	4	6	21	13	21
	<i>Escherichia coli</i>									
Ertapenem	108	74	67	17	8	-	1	4	9	10
Imipenem	118	71	62	12	7	-	1	7	7	11
Meropenem	118	73	71	13	2	-	1	5	7	9
	<i>Klebsiella ssp.</i>									
Ertapenem	2	4	3	5	6	10	21	38	70	63
Imipenem	-	1	-	-	5	8	23	38	46	43
Meropenem	-	3	3	1	-	8	26	45	56	48

A fim de avaliar o possível efeito de ano e tipo de cultura nas CIMs foram ajustados os modelos apresentados na Tabela 1, nos quais $\varepsilon_i \sim N(0, \sigma^2)$. Se Y representa a $\log(\text{CIM})$ conhecida exatamente, $[Y]$ representa a $\log(\text{CIM})$ censurada, com os limites de censura conhecidos. Assim, as sintaxes dos modelos também estão representadas na Tabela 1.

Tabela 19 – Modelos ajustados e suas respectivas sintaxes.

Modelo	Sintaxe
$Y_i = \beta_0 + \beta_1 \times \text{Ano} + \varepsilon_i$	$[Y] = \text{Ano}$
$Y_i = \beta_0 + \beta_1 \times \text{Tipo} + \varepsilon_i$	$[Y] = \text{Tipo}$
$Y_i = \beta_0 + \beta_1 \times \text{Tipo} + \beta_2 \times \text{Ano} + \varepsilon_i$	$[Y] = \text{Tipo} + \text{Ano}$

Seguindo os pressupostos fornecidos na Seção 4.2, assumindo que as observações de CIMs são retiradas de uma população regida pela distribuição Log-Normal, foi utilizado o procedimento LIFEREG do SAS (STUDIO, 2015), que ajusta modelos paramétricos a dados censurados.

As estimativas dos parâmetros, obtidas por máxima verossimilhança, com o algoritmo de Newton-Raphson, os erros-padrão das estimativas, obtidos a partir da inversa da matriz de informação observada e os intervalos de confiança estão apresentados nas Tabelas 4,5 e 6.

Tabela 20 – Estimativas dos parâmetros, erro padrão, intervalo de confiança e valor p para os três modelos observados para os três antimicrobianos para *Enterobacter* ssp.

Modelo	Parâmetro	Estimativa	Erro Padrão	IC	valor p
Ertapenem					
1	β_0	1.6841	0.4106	(0.8793; 2.4880)	0.9227
	β_1	-0.0144	0.1488	(-0.3060; 0.2772)	
2	β_0	1.9490	0.2193	(1.5191; 2.3788)	<.0001
	β_1	-1.6839	0.3645	(-2.3984; -0.9695)	
3	β_0	2.2481	0.4057	(1.4528; 3.0433)	<.0001
	β_1	-1.7317	0.3688	(-2.4545; -1.0090)	
	β_2	-0.1221	0.1311	(-0.3791; -0.1349)	
Imipenem					
1	β_0	-0.5649	0.4914	(-1.5280; 0.3983)	0.0534
	β_1	0.3248	0.1681	(-0.0047; 0.6544)	
2	β_0	0.2044	0.2368	(-0.2597; 0.6685)	0.6321
	β_1	0.2577	0.5383	(-0.7973; 1.3127)	
3	β_0	-0.5664	0.4925	(-1.5317; 0.3990)	0.9517
	β_1	0.0325	0.5371	(-1.0201; 1.0852)	
	β_2	0.3230	0.1709	(-0.0119; 0.6579)	
Meropenem					
1	β_0	-0.8127	0.8401	(-2.4593; 0.8339)	0.2220
	β_1	0.3544	0.2902	(-0.2144; 0.9231)	
2	β_0	0.0262	0.3888	(-0.7359; 0.7882)	0.6986
	β_1	0.5515	1.4243	(-2.2401; 3.3430)	
3	β_0	-0.8386	0.8479	(-2.5005; 0.8233)	0.7319
	β_1	0.4778	1.3945	(-2.2554; 3.2109)	
	β_2	0.3519	0.2911	(-0.2187; 0.9225)	

Tabela 21 – Estimativas dos parâmetros, erro padrão, intervalo de confiança e valor p para os três modelos observados para os três antimicrobianos para *Escherichia coli*.

Ertapenem					
Modelo	Parâmetro	Estimativa	Erro Padrão	IC	valor p
1	β_0	-28.8030	13.9882	(-56.2194; -1.3866)	0.0412
	β_1	9.7742	4.7879	(0.3901; 19.1584)	
2	β_0	1.8778	0.3397	(1.2121; 2.5436)	0.0001
	β_1	-3.6857	0.9653	(-5.5777; -1.7937)	
3	β_0	1.6233	0.4110	(0.8178; 2.4288)	<.0001
	β_1	-3.6853	0.8968	(-5.4429; -1.9277)	
	β_2	0.1080	0.1566	(-0.1989; 0.4150)	
Imipenem					
1	β_0	-16.1690	9.3808	(-34.5551; 2.2171)	0.0945
	β_1	3.6908	2.2074	(-0.6356; 8.0173)	
2	β_0	-2.5729	1.8999	(-6.2967; 1.1508)	0.9998
	β_1	-24.8654	112617.6	(-220751; 220701.6)	
3	β_0	-9.0246	6.4564	(-21.6790; 3.6298)	0.9998
	β_1	-22.5843	111590.1	(-218735; 218690.1)	
	β_2	2.0497	1.6080	(-1.1020; 5.2014)	
Meropenem					
1	β_0	-8.8410	3.3626	(-15.4316; -2.2505)	0.0105
	β_1	2.2950	0.8963	(0.5383; 4.0518)	
2	β_0	-0.2558	0.6036	(-1.4388; 0.9273)	0.9998
	β_1	-13.6385	57740.12	(-113182; 113154.9)	
3	β_0	-2.7508	2.1293	(-6.9241; 1.4224)	0.9998
	β_1	-12.5378	57555.49	(-112819; 112794.2)	
	β_2	0.8393	0.6318	(-0.3990; 2.0777)	

Tabela 22 – Estimativas dos parâmetros, erro padrão, intervalo de confiança e valor p para os três modelos observados para os três antimicrobianos para *Klebsiella* spp..

Modelo	Parâmetro	Estimativa	Erro Padrão	IC	valor p
Ertapenem					
1	β_0	2.4014	0.4184	(1.5813; 3.2214)	0.1967
	β_1	0.1657	0.1283	(-0.0858; 0.4171)	
2	β_0	2.6104	0.2329	(2.1539; 3.0670)	<.0001
	β_1	-2.2639	0.3308	(-2.9123; -1.6154)	
3	β_0	2.5374	0.3379	(1.8752; 3.1996)	<.0001
	β_1	-2.2470	0.3336	(-2.9008; -1.5932)	
	β_2	0.0258	0.0901	(-0.1509; 0.2025)	
Imipenem					
Modelo	Parâmetro	Estimativa	Erro Padrão	IC	valor p
1	β_0	0.2898	0.2869	(-0.2725; 0.8521)	0.2981
	β_1	0.1063	0.1022	(-0.0939; 0.3066)	
2	β_0	0.5399	0.1247	(0.2955; 0.7843)	0.4359
	β_1	0.4998	0.6414	(-0.7574; 1.7570)	
3	β_0	0.2993	0.2867	(-0.2627; 0.8613)	0.5240
	β_1	0.4114	0.6455	(-0.8538; 1.6765)	
	β_2	0.0968	0.1031	(-0.1052; 0.2988)	
Meropenem					
Modelo	Parâmetro	Estimativa	Erro Padrão	IC	valor p
1	β_0	1.0170	0.2167	(0.5924; 1.4416)	0.0436
	β_1	0.1624	0.0805	(0.0046; 0.3202)	
2	β_0	1.4417	0.0929	(1.2597; 1.6238)	0.1794
	β_1	-0.6000	0.4469	(-1.4760; 0.2759)	
3	β_0	1.0679	0.2204	(0.6360; 1.4998)	0.2808
	β_1	-0.4830	0.4478	(-1.3607; 0.3947)	
	β_2	0.1498	0.0808	(-0.0086; 0.3081)	

4.3.1 Resultados

Com o primeiro modelo é possível observar se existe tendência temporal, ou seja, a inserção da covariável “ano” permite avaliar se existe efeito dos anos na média da $\log(\text{CIM})$. Da mesma forma, no segundo modelo a inserção da covariável “Tipo” avalia se a média da $\log(\text{CIM})$ é maior em algum dos dois tipos de cultura. E com o terceiro modelo ao subdividir os isolados pelas duas covariáveis é possível verificar se há tendência ao longo dos anos dentro de cada grupo separado.

O primeiro modelo apresentou significância para as combinações: *Escherichia coli*-Ertapenem, com $\beta_1 = 9.77$ e IC (0.39;19.16); *Escherichia coli*-Meropenem, com $\beta_1 = 2.29$ e IC (0.39;19.16); *Klebsiella* ssp.-Ertapenem, com $\beta_1 = 0.16$ e IC (0.0046;0.32).

O Modelo 2 apresentou significância para as combinações: *Enterobacter* ssp.-Ertapenem, com $\beta_1 = -1.68$ e IC (-2.40;-0.97); *Escherichia coli*-Meropenem, com $\beta_1 = -3.69$ e IC

(-5.58; -1.93); *Klebsiella* ssp.-Ertapenem, com $\beta_1 = -2.26$ e IC (-2.91; -1.62).

No modelo 3 β_1 é referente à covariável “tipo” e β_2 “ano”. Para β_1 este modelo apresentou significância para: *Enterobacter* ssp.-Ertapenem, com $\beta_1 = -1.73$ e IC (-2.45; -1.01); *Escherichia coli*-Meropenem, com $\beta_1 = -3.69$ e IC (-5.44; -1.93); *Klebsiella* ssp.-Ertapenem, com $\beta_1 = -2.25$ e IC (-2.90; -1.59).

Para o parâmetro β_2 não houve nenhuma combinação que apresentasse significância.

4.4 Discussão

A KPC constitui um importante patógeno hospitalar, atualmente crescente no mundo inteiro (SEIBERT et al., 2008). Este patógeno é detectado por meio das culturas de vigilância realizadas com este objetivo. A detecção é realizada com a utilização de Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana (TSA), que resultam num gradiente de concentrações inibitórias mínimas de diversos antimicrobianos.

Uma das formas de analisar os resultados das CIMs, obtidos nos TSAs, é por meio de Análise de Sobrevivência, que considera a escala completa de concentrações observadas e a censura inerente a este dados. Estatisticamente, o aumento (ou diminuição) na CIM pode ser verificado com o ajuste de modelos de regressão para variáveis respostas censuradas e variáveis preditoras. Um aumento significativo na CIM pode caracterizar um aumento na resistência das bactérias a estes antimicrobianos.

Apesar de ser uma resposta censurada à esquerda, intervalarmente ou à direita, ainda é possível encaixar e testar modelos lineares para dados de CIM. Se as variáveis preditoras são todas efeitos fixos, os parâmetros do modelo podem ser estimados por máxima verossimilhança, e esta análise está disponível em muitos *softwares* padrões como SAS(PROC LIFEREG).

Neste estudo considerou-se importante avaliar as CIMs dos antimicrobianos da família dos Carbapenens (Ertapenem, Imipenem e Meropenem) para verificar se houve aumento ou diminuição da resistência das enterobactérias (*Enterobacter* spp., *E.coli* e *Klebsiella* spp.), possíveis portadoras da KPC, ao longo dos anos avaliados.

No Modelo 1 uma estimativa positiva de β_1 indica um aumento da média da $\log(\text{CIM})$ ao longo dos anos observados. Para verificar se este aumento é significativo observa-se se o zero está presente no Intervalo de Confiança (IC). Quando isso ocorre, há indícios de que a estimativa do parâmetro não é estatisticamente diferente de zero. O zero ausente no IC indica que houve um aumento médio significativo da concentração inibitória mínima ao longo dos anos observados, como nas três combinações destacadas.

No Modelo 2 foram comparadas as médias da $\log(\text{CIM})$ das culturas clínica e de vigilância. A cultura fixada como *baseline* foi a de vigilância, e uma estimativa negativa para β_1 indica que a média da $\log(\text{CIM})$ da cultura clínica é menor que da de vigilância para estas com-

binacões. Para os casos em que foi observada significância, o zero não está presente no IC, as estimativas de β_1 foram negativas indicando que a média da cultura clínica é menor que da de vigilância.

No Modelo 3, foi avaliado conjuntamente se há um aumento médio da $\log(\text{CIM})$ ao longo dos anos dentro de cada um dos tipos de cultura. O parâmetro β_1 , referente ao tipo de cultura, apresenta significância para as mesmas combinações do Modelo 2. Já para o parâmetro β_2 referente ao ano, não houve nenhuma combinação que apresentasse significância, indicando que ao separar os isolados por tipo de culturas e anos, não se observa tendência temporal dentro de cada grupo.

As análises realizadas mostram que na bactéria *E.coli* houve um aumento significativo da média da $\log(\text{CIM})$ durante os anos observados, indicando um aumento da resistência desta bactéria aos antimicrobianos Ertapenem e Meropenem. O mesmo também pode ser observado na bactéria *Klebsiella* spp. em relação ao Meropenem.

As análises evidenciam também que a média da $\log(\text{CIM})$ de cultura clínica é significativamente menor que da cultura de vigilância para o antimicrobiano Ertapenem nas três bactérias.

E por fim pode-se observar que quando subdivide os dados por “tipo” e “ano” a diferença entre a média dos grupos é mantida, mas não se observa mais um aumento significativo da CIM ao longo dos anos.

CAPÍTULO 5

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho permitiu a utilização de diferentes abordagens estatísticas para análise de dados de CIM, recebidos do projeto “Vigilância Epidemiológica de Bactérias Multirresistentes no Hospital Universitário Regional de Maringá”.

Na primeira abordagem foram avaliados isolados de *Staphylococcus* spp. para tendência temporal na resistência bacteriana. Estes foram coletados entre os anos de 2011 e 2016. A CIM foi utilizada para dicotomizar os resultados em resistentes ou suscetíveis, utilizando os pontos de interrupção clínica fornecidos pelo CLSI, para os seis anos. Foram avaliados cinco antimicrobianos: Clindamicina, Eritromicina, Oxacilina, Rifampicina e Tetraciclina. Para nenhum deles houve mudança no *breakpoint* nos anos observados.

Após a dicotomização, a proporção de isolados resistentes observados foi utilizada para verificar se houve tendência temporal de aumento ou diminuição da resistência bacteriana por meio do teste de tendência de Cochran-Armitage e de um modelo de Regressão Logística, com função de ligação *logit*.

Para esses isolados, as análises evidenciaram uma diminuição significativa na tendência da resistência bacteriana aos antimicrobianos Clindamicina, Oxacilina, Rifampicina e Tetraciclina. Isto pode ser observado nos resultados dos dois métodos.

Também foi possível observar, comparando os dois métodos, que o modelo de Regressão Logística fornece recursos adicionais que permitem, além de detectar a tendência, avaliar se ela está aumentando ou diminuindo, e ainda quantificar este aumento ou diminuição em termos de prevalência da resistência, fornecida pela OR.

Esta abordagem dicotômica tem como principal característica favorável a simplicidade da análise. A escala binária é muito atraente estatisticamente, pois definido o *breakpoint* é possível classificar claramente os isolados em R e S, garantindo robustez para as classificações. No entanto, a escolha dos *breakpoints* é a principal limitação desta abordagem, pois eles não são

unificados internacionalmente e ainda podem sofrer variações periódicas, como os fornecidos pelo CLSI, que são atualizados anualmente.

Além disto, ao dicotomizar a escala completa da CIM acontece perda de informação. As tendências que ocorrerem abaixo ou acima do ponto de interrupção clínico não serão detectadas. Pode ser relevante detectar esta tendência o quanto antes, e para isto é necessário considerar a escala completa das CIMs, o que leva à segunda abordagem, na qual a variável resposta CIM é observada de forma contínua e censurada.

Neste trabalho foram comparadas as distribuições das CIMs das estirpes de enterobactérias *Klebsiela spp.*, *Escherichia coli* e *Enterobacter spp.*, frente aos antimicrobianos da família dos Carbapenens Ertapenem, Imipenem e Meropenem, obtidas pelos métodos de vigilância e de cultura clínica, isoladas entre os anos de 2012 e 2016. As comparações foram realizadas a partir dos resultados provenientes dos ajustes de modelos de regressão na presença de respostas censuradas.

As análises realizadas mostram que na bactéria *E.coli* houve um aumento significativo da média da $\log(\text{CIM})$ durante os anos observados, indicando um aumento da resistência desta bactéria aos antimicrobianos Ertapenem e Meropenem. O mesmo também pode ser observado na bactéria *Klebsiella spp.* em relação ao Meropenem.

As análises evidenciam também que a média da $\log(\text{CIM})$ de cultura clínica é significativamente menor que da cultura de vigilância para o antimicrobiano Ertapenem nas três bactérias.

E por fim, pode-se observar que quando os dados foram subdivididos em “tipo” e “ano”, a diferença entre a média dos grupos foi mantida, mas não se observou mais um aumento significativo da CIM ao longo dos anos, em qualquer combinação.

5.1 Propostas Futuras

Com o objetivo de dar continuidade ao estudo da CIM, estabelecemos como propostas para trabalhos futuros:

1. Aprofundar o conhecimento sobre os antimicrobianos do artigo 1 que apresentaram redução significativa na tendência temporal, quando se sabe que a tendência no mundo é apresentar aumento.
2. Considerar um Modelo de Mistura para os dados, considerando que os isolados suscetíveis e os resistentes têm diferentes distribuições de probabilidade.
3. Considerar a adição de covariáveis de efeito aleatório. Quando este tipo de covariáveis são adicionadas ao modelo, a estimação dos parâmetros por máxima verossimilhança fica inviável, então é necessária uma abordagem Bayesiana.

REFERÊNCIAS

- AERTS, M.; FAES, C.; NYSEN, R. Development of statistical methods for the evaluation of data on antimicrobial resistance in bacterial isolates from animals and food. *EFSA Supporting Publications*, Wiley Online Library, v. 8, n. 12, 2011. Citado 13 vezes nas páginas 13, 14, 15, 16, 30, 31, 32, 33, 35, 39, 40, 42 e 44.
- AGRESTI, A. *Categorical data analysis*. [S.l.]: Wiley-Interscience, 2002. Citado na página 14.
- AGRESTI, A. *Categorical data analysis*. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2013. Citado na página 39.
- ANNIS, D. H.; CRAIG, B. A. Statistical properties and inference of the antimicrobial mic test. *Statistics in medicine*, Wiley Online Library, v. 24, n. 23, p. 3631–3644, 2005. Citado 4 vezes nas páginas 14, 15, 17 e 44.
- ARMITAGE, P. Tests for linear trends in proportions and frequencies. *Biometrics*, JSTOR, v. 11, n. 3, p. 375–386, 1955. Citado na página 32.
- AZEVEDO, S. M. M. *Farmacologia dos Antibióticos Beta-lactâmicos*. Tese (Doutorado) — [sn], 2014. Citado 2 vezes nas páginas 16 e 43.
- BRASIL. Nota técnica nº 01/2013 -medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multirresistentes. agência nacional de vigilância sanitária. 2013. Citado na página 43.
- CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. m100-s21th. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, Wayne, PA., 2011. Citado na página 32.
- CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. m100-s22th. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, Wayne, PA., 2012. Citado na página 32.
- CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. m100-s23th. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, Wayne, PA., 2013. Citado na página 32.
- CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. m100-s24th. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, Wayne, PA., 2014. Citado na página 32.
- CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. m100-s25th. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, Wayne, PA., 2015. Citado na página 32.
- CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. m100-s26th. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, Wayne, PA., 2016. Citado 2 vezes nas páginas 31 e 32.

- CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. m100-s27th. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, Wayne, PA., 2017. Citado na página 13.
- COCHRAN, W. G. Some methods for strengthening the common χ^2 tests. *Biometrics*, JSTOR, v. 10, n. 4, p. 417–451, 1954. Citado na página 32.
- CORTINHAS, C. S. et al. Minimum inhibitory concentrations of cephalosporin compounds and their active metabolites for selected mastitis pathogens. *American journal of veterinary research*, Am Vet Med Assoc, v. 74, n. 5, p. 683–690, 2013. Citado 4 vezes nas páginas 15, 17, 31 e 44.
- CUNHA, E. E.; MELO, T. P. de. Análise de sobrevivência não-paramétrica da idade ao primeiro parto em fêmeas nelore: Um estudo de simulação. *Rev. Bras. Biom*, v. 30, n. 3, p. 305–325, 2012. Citado na página 15.
- DIENSTMANN, R. et al. Avaliação fenotípica da enzima klebsiella pneumoniae carbapenemase (kpc) em enterobacteriaceae de ambiente hospitalar. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial, v. 46, n. 1, p. 23–27, 2010. Citado 2 vezes nas páginas 42 e 43.
- FERREIRA, P. A. M. *Diagnóstico Microbiológico e Previsão da Eficácia da Antibioterapia em Infecções do Trato Urinário*. Tese (Doutorado) — Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto., 2014. Citado na página 31.
- GOMES, M. J. Gênero staphylococcus spp. *LABACVET-URGS-Porto Alegre*, 2013. Citado na página 32.
- HE, F. et al. Tigecycline susceptibility and the role of efflux pumps in tigecycline resistance in kpc-producing klebsiella pneumoniae. *PloS one*, Public Library of Science, v. 10, n. 3, p. e0119064, 2015. Citado 2 vezes nas páginas 16 e 42.
- HOMBACH, M.; BLOEMBERG, G. V.; BÖTTGER, E. C. Effects of clinical breakpoint changes in clsi guidelines 2010/2011 and eucast guidelines 2011 on antibiotic susceptibility test reporting of gram-negative bacilli. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, Oxford University Press, v. 67, n. 3, p. 622–632, 2011. Citado 2 vezes nas páginas 13 e 31.
- HOSMER, D. W.; LEMESHOW, S.; STURDIVANT, R. X. *Applied logistic regression*. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2013. v. 398. Citado 3 vezes nas páginas 34, 39 e 40.
- JASPERS, S.; AERTS, M.; VERBEKE, G. Estimation of an mic distribution using a two-stage semi-parametric mixture model. Instituto Poligrafico Europeo, 2013. Citado 4 vezes nas páginas 11, 16, 30 e 42.
- KAPLAN, E. L.; MEIER, P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *Journal of the American statistical association*, Taylor & Francis, v. 53, n. 282, p. 457–481, 1958. Citado na página 15.
- KASSTEELE, J. van de et al. New statistical technique for analyzing mic-based susceptibility data. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, Am Soc Microbiol, v. 56, n. 3, p. 1557–1563, 2012. Citado 3 vezes nas páginas 15, 17 e 44.
- KLEIN, J. P.; MOESCHBERGER, M. L. *Survival analysis: techniques for censored and truncated data*. [S.l.]: Springer Science & Business Media, 2005. Citado 2 vezes nas páginas 15 e 44.

- LEE, E. T.; WANG, J. *Statistical methods for survival data analysis*. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2003. v. 476. Citado na página 15.
- LEE, M.-L. T.; WHITMORE, G. Statistical inference for serial dilution assay data. *Biometrics*, Wiley Online Library, v. 55, n. 4, p. 1215–1220, 1999. Citado 6 vezes nas páginas 11, 15, 17, 42, 44 e 45.
- LEVY, C. E. et al. Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção em serviços de saúde. *Módulo V. Detecção e identificação das bactérias de importância médica*. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde, 2004. Citado 2 vezes nas páginas 16 e 30.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. Microbial growth. *Brock biology of microorganisms*, Prentice Hall Upper Saddle River, NJ, p. 137–166, 2003. Citado 2 vezes nas páginas 11 e 30.
- MONTGOMERY, D. C.; PECK, E. A. *Introduction to Linear Regression Analysis*. [S.l.]: John Wiley and Sons, Inc., New York., 1992. v. 2nd ed. Citado na página 34.
- MONTGOMERY, D. C.; PECK, E. A.; VINING, G. G. *Introduction to linear regression analysis*. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2012. v. 821. Citado na página 39.
- OLIVEIRA, H. C. de; STRANIERI, I. *NOTA TÉCNICA Nº 01/2011- ENTENDA MAIS SOBRE A KPC*. 2011. Disponível em: <<https://www.ufmt.br/hujm/arquivos/90a1fa1519ea5fdb695df6978aeeec758.pdf>>. Acesso em: 27 abril 2017. Citado 2 vezes nas páginas 16 e 43.
- PAULA, V. G. de et al. Enterobactérias produtoras de carbapenemase: reflexão sobre o surgimento de superbactérias em uti's. *Universitas: Ciências da Saúde*, v. 14, n. 2, 2016. Citado na página 42.
- PELOSO, P. F. D. *Antibiograma: NCCLS, Kirk-Bauer e Automação. "Uma Visão Crítica"*. 2011. Disponível em: <<https://www.sbpc.org.br/upload/conteudo/320070131164715.pdf>>. Acesso em: 18 novembro 2017. Citado na página 31.
- POSSEBON, M. I.; CAMARGO, E. A. Resistência bacteriana aos carbapenêmicos. *RBM Revista Brasileira de Medicina*, v. 60, n. 6, p. 378–378, 2003. Citado 2 vezes nas páginas 16 e 42.
- REINSTEIN, S. et al. Prevalence of escherichia coli o157: H7 in organically and naturally raised beef cattle. *Applied and environmental microbiology*, Am Soc Microbiol, v. 75, n. 16, p. 5421–5423, 2009. Citado na página 42.
- ROLLO, S. N. *Herd-level risk factors associated with antimicrobial susceptibility patterns and distributions in fecal bacteria of porcine origin*. Tese (Doutorado) — Texas A&M University, 2011. Citado 8 vezes nas páginas 11, 14, 15, 16, 39, 40, 42 e 44.
- SANTOS, A. L. dos et al. Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial, v. 43, n. 6, p. 413–423, 2007. Citado 2 vezes nas páginas 20 e 32.
- SAS, I. *SAS/STAT® 9.22 User's Guide*. [S.l.]: Cary, nC: SaS insitute inc, 2010. Citado na página 33.

- SEIBERT, G. et al. Infecções hospitalares por enterobactérias produtoras de klebsiella pneumoniae produtora de carbapenemase em um hospital escola. *Scielo, einstein*, v. 12, n. 3, p. 282–286, 2008. Citado na página 52.
- SHENG, Z.-k. et al. Emergence of klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing proteus mirabilis in hangzhou, china. *Chinese Medical Journal (English Edition)*, v. 123, n. 18, p. 2568, 2010. Citado 2 vezes nas páginas 16 e 43.
- STUDIO, R. Rstudio: integrated development environment for r. *RStudio Inc, Boston, Massachusetts*, 2012. Citado na página 39.
- STUDIO, S. 3.4: *User's Guide SAS Institute Inc Cary*. [S.l.]: NC, 2015. Citado 3 vezes nas páginas 18, 32 e 48.
- TURNIDGE, J.; KAHLMETER, G.; KRONVALL, G. Statistical characterisation of bacterial wild-type mic value distributions and the determination of epidemiological cut-off values. *Clinical Microbiology and Infection*, Elsevier, v. 12, n. 5, p. 418–425, 2006. Citado 2 vezes nas páginas 15 e 44.
- WIENKE, A. *Frailty models in survival analysis*. [S.l.]: CRC Press, 2010. Citado na página 15.
- WU, H. *Statistical inference for minimum inhibitory concentration data*. Tese (Doutorado) — Dept. of Statistics and Actuarial Science-Simon Fraser University, 2008. Citado 4 vezes nas páginas 11, 15, 44 e 45.
- ZARPELLON, M. N. *Vigilância epidemiológica de bactérias multirresistentes aos antimicrobianos em um hospital ensino: uma experiência de três anos*. Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, 2015. Citado 3 vezes nas páginas 20, 31 e 43.