



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

FERNANDA SAAD RODRIGUES

Fatores Associados à Aquisição Nosocomial de Bacilos Gram-Negativos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu em Diferentes Estações do Ano: Um Estudo Tipo Caso-Caso.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, *Campus* de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais

Orientador(a): Prof. Dr. Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza

Botucatu, 2018

Fernanda Saad Rodrigues

Fatores Associados à Aquisição Nosocomial de Bacilos Gram-Negativos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu em Diferentes Estações do Ano: Um Estudo Tipo Caso-Caso.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, *Campus* de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais

Orientador (a): Prof.Dr. Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza

Botucatu, 2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Rodrigues, Fernanda Saad.

Fatores associados à aquisição de bacilos gram-negativos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu em diferentes estações do ano : um estudo tipo caso - caso / Fernanda Saad Rodrigues. - Botucatu, 2018

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza
Capes: 40101096

1. Bacilos gram-negativos. 2. Infecção hospitalar - Prevenção. 3. Sazonalidade. 4. Bacteremia. 5. Medicina tropical.

Palavras-chave: Bacteremia; Infecção hospitalar; Sazonalidade.

Dedicatória

Como não poderia deixar de ser, dedico esta vitória aos meus pais, Cibele e Charles, pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida, e com este não foi diferente. Nada do que sou hoje, e das conquistas que fiz, seria possível sem o amor, paciência e conselhos de vocês. Muito obrigada.

Dedico para meu melhor amigo e irmão, Rodrigo, por todas as risadas juntos, pelas visitas inesperadas e maravilhosas, pela preocupação apesar de toda a distância e por todos os “tchibuns”, de coração.

Ao meu amor, namorado, noivo e quase marido Bruno, que mais sofreu comigo e estive diariamente na luta que foi concluir com êxito esta dissertação. Meu melhor colo, companhia de almoço, de noites em claro e o melhor companheiro que existe. Por sua presença em minha vida, sou eternamente grata.

Aos meus avós, Nagibe, Therezinha e Isaac, os meus grandes exemplos de vida. Que eu sempre tenha a personalidade da Nagibe, a felicidade da Therezinha e a convicção do Isaac. Sei que sou privilegiada de ainda ter vocês ao meu lado. E ao meu avô Oswaldo, a saudades é diária e eu sei que de algum lugar você está orgulhoso de mim.

Agradecimientos

Ao Prof. Dr. Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza, pela orientação, paciência, auxílio e amizade ao longo de não só os dois anos de mestrado, mas nos meus cinco anos de Unesp.

A todos os outros docentes e médicos contratados do Departamento de Doenças Tropicais, em especial à Prof^a Dr^a Lenice do Rosário de Souza, pelos maravilhosos conselhos e ensinamentos, que levarei para toda a vida.

À equipe multiprofissional da enfermaria de Moléstias Infecciosas e Parasitárias, onde morei durante todo meu tempo em Botucatu, obrigada por serem minha segunda família e transformarem o trabalho do dia - a - dia mais leve.

Aos residentes que estiveram comigo ao longo deste anos: Eraldo, Jonas, Gabriel, Felipe, Thaysa, Henrique e Bruno - este mestrado não existiria sem o apoio, ombro amigo, paciência, idas à Toca do Lobo e toda a torcida de vocês. Obrigada.

A Milena e Livia, as melhores amigas que eu jamais imaginei que encontraria, e com certeza as pessoas mais essenciais na minha vida durante todo este período. Do primeiro dia de residência, para o mundo. Obrigada por serem minha luz guia ontem, hoje e sempre.

Aos amigos que ficaram em Sorocaba, tão longe mais tão perto: Fernanda, Vanessa, André, Bruna, Carol, Laímara e Marcos - obrigada pela paciência e por ouvirem meus longos desabaços à distância.

Aos Tios e tias das famílias Saad e Rodrigues, obrigada por mesmo longe sempre torcerem pelo meu sucesso e vibrarem com cada conquista e, sempre que possível, se fizerem presentes.

A todos que de alguma forma colaboraram para que este projeto fosse possível, obrigada.

Sumário

Sumário

RESUMO	12
Palavras-chave	13
ABSTRACT	15
Key-words	16
INTRODUÇÃO	18
Sazonalidade das doenças infecciosas.....	18
Sazonalidade em infecções relacionadas à assistência à saúde	22
Estudos “case-only” e “caso-caso”.....	26
Justificativa do estudo.....	30
OBJETIVOS	32
Objetivos gerais	32
Objetivos específicos.....	32
METODOLOGIA	35
Local e período de estudo	35
Delineamento do estudo.....	36
Procedimentos Operacionais do Estudo.....	37
Análise estatística	38
RESULTADOS	41
Artigo científico.....	58
DISCUSSÃO.....	83
CONCLUSÃO	90
REFERÊNCIAS.....	92

Resumo

RESUMO

A sazonalidade das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) foi relatada recentemente, especialmente envolvendo bacilos Gram-negativos (BGN). Fatores subjacentes a este fenômeno não foram elucidados. É teoricamente concebível que ele reflita variações sazonais nos fatores de risco tradicionais para essas infecções. Com isso em mente, realizamos um estudo para analisar a interação da estação, do clima e dos preditores habituais das Infecções de Corrente Sanguínea (ICS) causadas pelo bacilos Gram-negativos (ICS-BGN). O estudo teve um desenho retrospectivo, tipo “caso-caso”. Foi realizado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (450 leitos). O estudo incluiu 446 pacientes com ICS-BGN causados por *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa* ou *Acinetobacter baumannii*, diagnosticados entre julho de 2012 e junho de 2016. Os dados demográficos, comorbidades, procedimentos invasivos e uso de antimicrobianos foram revisados em prontuários médicos. A estação em que ocorreu a ICS-BGN, bem como os parâmetros meteorológicos do dia do diagnóstico, foram registrados. Analisamos os fatores associados à ocorrência de ICS-BGN em diferentes estações (com o inverno como categoria de referência) e causados por diferentes BGN (categoria de referência, *E. coli*). Modelos univariados e multivariados de regressão logística politômica (multinomial) foram utilizados para análise. Na análise multivariada, as ICS-BGN diagnosticadas no verão eram mais provavelmente causadas por *Klebsiella*

spp. (OR, 5,33; IC 95%, 2,04-13,96) ou *A. baumannii* (OR, 2,69; IC 95%, 1,04-6,96), e houve associação entre *Klesbiella* spp. e primavera (OR, 2,86; IC 95%, 1,14-7,18). A temperatura média no dia do diagnóstico foi associada a *Klebsiella* spp. (OR, 1,19; IC 95%, 1,07-1,33) e *A. baumannii* (OR, 1,20; IC 95%, 1,07-1,34). Concluimos que as estações quentes e a temperatura diária exercem impacto sobre a etiologia das ICS-BGN, mesmo em modelos ajustados para os fatores de risco habituais. Nossos achados reforçam a tese de que a sazonalidade dos patógenos nosocomiais é intrínseca aos microrganismos e não está associada a comorbidades, procedimentos ou uso de antimicrobianos.

Palavras-chave

Infecções relacionadas à assistência à saúde; Bacilos Gram-negativos; Infecções da Corrente Sanguínea; Sazonalidade; Meteorologia.

Abstract

ABSTRACT

Seasonality of healthcare-associated infections (HCAIs) has been recently reported, especially involving Gram-negative bacilli (GNB). Factors underlying this phenomenon were not elucidated. It is theoretically conceivable it reflects seasonal variations in traditional risk factors for those infections. With this in mind, we conducted a study to analyze the interplay of season, weather and usual predictors of healthcare-associated bloodstream infections caused by Gram-negative bacilli (GNB-BSI). The study had a retrospective, case-only design. It was conducted in the teaching hospital from Botucatu School of Medicine (450 beds). The study enrolled 446 patients with GNB-BSI caused by *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Pseudomonas aeruginosa* or *Acinetobacter baumannii*, diagnosed from July 2012 through June 2016. Demographic data, comorbidities, invasive procedures and use of antimicrobials were reviewed in medical charts. The season in which GNB-BSI occurred, as well as weather parameters of the day of diagnosis, were recorded. We analyzed factors associated with occurrence of GNB-BSI in different seasons (with winter as reference category) and caused by different GNB (reference category, *E. coli*). Univariate and multivariable models of polytomous (multinomial) logistic regressions were used for analysis. In multivariable analysis, GNB-BSI diagnosed in summer were more likely to be caused by *Klebsiella* spp. (OR, 5.33; 95%CI, 2.04-13.96) or *A. baumannii* (OR, 2.69; 95%CI, 1.04-6.96), and there

was association of *Klesbiella* spp. and spring (OR, 2.86; 95%CI, 1.14-7.18). Average temperature (in Celsius degrees[°C]) in the day of diagnosis was associated with *Klebsiella* spp. (OR, 1.19; 95%CI, 1.07-1.33) and *A. baumannii* (OR, 1.20; 95%CI, 1.07-1.34). In conclusion, warm seasons and daily temperature impact on the etiology of GNB-BSI, even in models adjusted for usual risk factors. Our findings support the thesis that seasonality of healthcare-associated pathogens is intrinsic to microorganisms, and not associated with comorbidities, procedures or use of antimicrobials.

Key-words

Healthcare-associated infections; Gram-negative bacilli; Bloodstream infections; Seasonality; Meteorology.

Introdução

INTRODUÇÃO

Sazonalidade das doenças infecciosas

A regularidade dos fenômenos climáticos foi percebida pelos seres humanos desde a mais remota antiguidade. Nela foram baseadas as crenças, movimentos de migração e atividades de subsistência, como a agricultura e a caça.¹ Hipócrates, em seu célebre livro *Ares, águas e lugares*, registrou o impacto do clima e das estações do ano sobre a ocorrência de diversas doenças.²

No dicionário Houaiss, o termo “sazonal” é definido como “relativo a estação do ano; próprio de uma estação; estacional”.³ Em uma importante revisão sobre o tema, Altizer et al.⁴ afirmam que “alterações sazonais são cíclicas, amplamente previsíveis, e sem dúvida representam a mais poderosa e universal fonte de variações externas que influenciam sistemas naturais e humanos.”

A Sazonalidade é definida como variação periódica cíclica e regular de eventos e é marcada por três características^{5,6}:

- Um ponto no tempo quando a curva sazonal atinge seu máximo;
- A amplitude entre o pico e o nadir;
- A duração do período de aumento definido pela forma da curva.

Um exemplo claro de sazonalidade, com as características citadas acima bastante pronunciadas se observa nas condições climáticas. A **Figura 1** mostra a temperatura média mensal para o município de Botucatu, uma situação de sazonalidade evidente, com seus dois componentes: variação e regularidade.

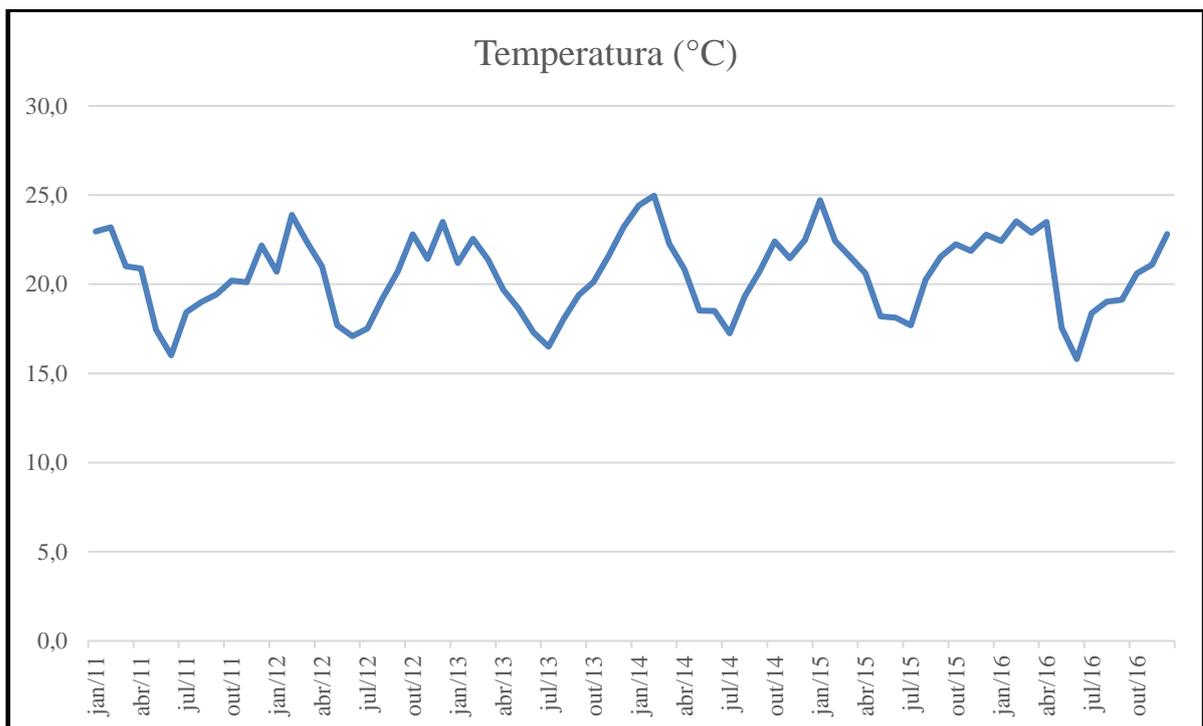


Figura 1. Variação da temperatura média mensal em Botucatu(SP) entre 2011 e 2016, parâmetro de sazonalidade evidente, com picos entre dezembro e fevereiro, e vales em junho-julho (Dados obtidos na Estação Meteorológica da Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP, Botucatu-SP).

Quando aplicada às doenças, a sazonalidade se apresenta sob a forma de surtos periódicos correspondentes a estações do ano ou outros

períodos de calendário estereotipados.⁶ O comportamento sazonal das doenças infecciosas pode interferir na variação espacial e temporal das epidemias, influenciando tanto no início quanto na persistência. Influencia também diagnósticos e tratamentos empíricos, e pode guiar intervenções de prevenção e controle.⁵ Um exemplo clássico são as vacinações contra influenza, realizadas no outono de ambos os hemisférios.⁷

A característica sazonal já é bem estabelecida para algumas doenças, como infecções do trato gastrintestinal, respiratórias e transmitidas por vetores.^{6,8,9,10,11,12,13} Em alguns casos há diferença de padrão entre países em desenvolvimento e desenvolvidos. No caso das diarreias, os primeiros tem como etiologia frequente bactérias, que ocorrem em épocas de chuva; nos países desenvolvidos, por sua vez, a maior incidência de casos de diarreia ocorre no inverno, sendo a etiologia predominantemente viral.^{4,8,14}

Apesar de bem conhecida a correlação entre doenças infecciosas e sazonalidade, pouco se sabe sobre seus mecanismos. No que diz respeito a doenças transmitidas por vetores (ex.: mosquitos ou carrapatos), é mais fácil estabelecer associação com a ecologia desses agentes.¹⁵ Para doenças transmitidas de pessoa a pessoa essa associação é mais complexa, e pobremente compreendida até o momento.^{4,8} Acredita-se no entanto que seja fruto de determinantes múltiplos, tais como^{4,6,16}:

- Comportamento humano – é o componente mais atrativo sob o ponto de vista intuitivo e tem como principal exemplo a associação de grandes acumulados de pessoas e a transmissão de patógenos no inverno,

mas poucos dados científicos corroboram tal etiologia;

- Efeito do ambiente no patógeno – temperatura, umidade e precipitação são determinantes na população, sobrevivência, virulência e transmissibilidade de patógenos. O aumento de temperatura leva a expressão direta de fatores de virulência em bactérias como *Legionella sp.*, *Neisseria sp.*, e *E. coli* verotoxigênica.

- Alterações no hospedeiro – mudanças no metabolismo do hospedeiro como a diminuição de vitamina D no inverno podem estar relacionadas a alteração imune e favorecimento de infecção em certas estações.

De acordo com estes achados, pode-se inferir que países nas zonas temperadas, subtropicais e tropicais dos hemisférios norte e sul teriam uma variação de aproximadamente seis meses entre suas epidemias. Já em localidades muito próximas à linha do Equador, não veríamos esta influência. No entanto, em estudos realizados com diversos países nem sempre essa realidade foi encontrada. Em parte, isso se deve ao fato de que, apesar de pré-estabelecidas as estações do ano, o clima apresenta diversas intempéries que alteram as condições padrão de primavera, verão, outono e inverno.⁶

Sazonalidade em infecções relacionadas à assistência à saúde

As infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) são uma ameaça para pacientes hospitalizados em todo o mundo, sendo causa de alta morbimortalidade.^{17,18,19} Estima-se que entre 5% e 10% dos pacientes internados em hospitais no países desenvolvidos adquiram IRAS, e esse número é cinco vezes maior naqueles em desenvolvimento.²⁰

Embora todos os indivíduos atendidos em serviços de saúde estejam sob risco de aquisição de IRAS, esse agravo é particularmente incidente nas unidades de terapia intensiva (UTI).^{21, 22, 23} No estado de São Paulo, no Brasil, os dados de UTI informados ao Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac” (CVE) em 2016 demonstram uma densidade de incidência por 1000 dispositivos - dia de: pneumonia associada a ventilação mecânica (PAV) = 9,17; infecção de corrente sanguínea associada ao uso de cateter venoso central = 3,37; e infecção do trato urinário relacionada ao uso de sonda vesical de demora = 3,13.²⁴ O Centro de Controle de Doenças da Europa reportou em 2014 uma incidência de 8% de infecção hospitalar em pacientes que permanecessem mais que dois dias internados em unidades de terapia intensiva. A densidade de incidência por 1000 dispositivos – dia foi de: 3,86 para pneumonia; 1,7 para infecção de corrente sanguínea; e 1,1 para infecção do trato urinário.²⁵

É relevante o fato de que as IRAS são importante causa de mortalidade em todo o mundo.^{26,27} Elas também deixam sequelas²⁸, tem impacto sobre permanência e custos hospitalares.^{29,30}

Tradicionalmente, os fatores causais das IRAS tem sido identificados entre processos de trabalho na assistência (incluindo procedimentos e dispositivos invasivos, imunossupressão iatrogênica e uso de antimicrobianos) ou atribuídos à suscetibilidade do paciente.^{31,32} O relato de sazonalidade na incidência de IRAS é recente, e acrescenta uma nova variável a ser considerada nas estratégias de prevenção desses agravos.³³

Nos últimos anos, desenvolveu-se um corpo de evidência de sazonalidade para diversos sítios de IRAS, incluindo: (a) infecções virais entéricas (rotavirus com picos em primavera, norovirus mais incidente no verão)^{34,35}; (b) peritonites associadas à diálise, com elevações no verão³⁶; (c) infecções de sítio cirúrgico, também associadas a verão e períodos de maior temperatura ambiente.^{37,38,39}

A sazonalidade é mais pronunciada em infecções (inclusive de corrente sanguínea [ICS]) causadas por bacilos Gram-negativos.³³ As primeiras evidências dessa sazonalidade foram aumentos de incidência de *Acinetobacter baumannii* no verão, relatados pelo *National Nosocomial Infection Surveillance System* (NNIS) dos Estados Unidos.⁴⁰ Posteriormente, foram descritos “picos de verão” para *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *A. baumannii*.⁴¹ Um outro estudo identificou sazonalidade de ICS causada por *Klebsiella pneumoniae* em quatro hospitais localizados em países de diferentes continentes (Estados Unidos, França, Taiwan e Austrália).⁴² Posteriormente, Eber et al⁴³ relataram sazonalidade e associação com altas temperaturas ambientais em ICS

causadas por vários microrganismos. Também se constatou a sazonalidade de pneumonias causadas por *A. baumannii*, com o mesmo padrão de predomínio no verão.⁴⁴ De forma interessante, esses estudos foram conduzidos majoritariamente em países de clima temperado e em hospitais com climatização artificial (nos quais não se espera uma variação da temperatura interna).³³ Esse aspecto é reforçado por pesquisa alemã que identificou associação entre temperatura ambiente externa ao hospital e aumento de infecções por BGN em UTI⁴⁵ e pelo recente achado de aumento da incidência de ICS por BGN na Grécia.⁴⁶

Nos países tropicais, há menor variação de temperatura entre as diferentes estações do ano. Por outro lado, os hospitais são geralmente não climatizados, ou tem controle climático em somente algumas unidades de internação. Se adotamos uma perspectiva espacial, é digno de nota o relato de aumento de infecções por BGN em hospitais mais próximos do equador.⁴⁷ Há poucos estudos sobre sazonalidade de IRAS e BGN conduzidos em localidades de clima tropical. Pesquisa conduzida em Curitiba (a rigor, um local com clima sub-tropical) demonstrou sazonalidade e influência da temperatura e umidade em infecções de diversos sítios causadas por *P. aeruginosa*.⁴⁸ Um estudo ecológico do nosso grupo, abordando ICS, encontrou sazonalidade e associação com temperatura para BGN em geral, *A. baumannii* e *Enterobacter spp.*⁴⁹ Na análise de dados individuais, tanto a incidência de BGN totais quanto de *A. baumannii* estavam associadas a temperaturas elevadas nos sete dias que precederam o diagnóstico da

infecção.⁵⁰ Sob uma perspectiva diferente, também identificamos associação entre temperatura e maior risco de infecções do sítio cirúrgico (dados ainda não publicados).

Se a sazonalidade das doenças infecciosas por si só tem aspectos pouco compreendidos, os fatores associados a esse fenômeno em IRAS como um todo (e em particular nas infecções por BGN) são ainda mais obscuros. Algumas hipóteses causais foram levantadas^{33,43}: (a) redução de número de profissionais da saúde (*understaffing*) devido às férias de verão; (b) expressão de fatores de virulência e aumento da invasividade bacteriana em períodos quentes^{51,52}; (c) aumento dos reservatórios ambientais de BGN nos serviços de saúde.

Uma quarta hipótese foi aventada, considerando a possibilidade de proliferação de BGN em reservatórios fora dos hospitais, e transporte para o interior dos serviços de saúde por profissionais. Essa hipótese foi reforçada por dois achados. O primeiro, já relatado acima, é a sazonalidade observada mesmo em hospitais 100% climatizados. O segundo, foi a constatação de que os "picos de verão" de *A. baumannii* eram ocasionalmente causados por cepas multidroga-suscetíveis⁵³ ou eram policlonais⁵⁴, sugerindo baixa transmissão pessoa a pessoa no interior dos hospitais. No entanto, outros estudos, como o de Eber et al⁴³, não corroboraram essa hipótese, encontrando elevação sazonal de isolados multidroga-resistentes, característica típica de cepas nosocomiais.

A confirmação do padrão sazonal e/ou da interferência parâmetros

meteorológicos na incidência das IRAS (inclusive aquelas causadas por BGN) pode facilitar o direcionamento dos esforços e políticas de controle de infecção. Identificando suas causas, as possibilidades de prevenção e controle serão ainda maiores.

Estudos “case-only” e “caso-caso”

Muitas doenças infecciosas são reportadas a sistemas de vigilância estaduais/nacionais, utilizados para monitorar tendências e detectar surtos e epidemias. Tais sistemas costumam ser incompletos e subnotificados quando comparado com o total da população doente, o que não é um problema quando as taxas são constantes²¹.

Para estudo dessas doenças, um dos principais modelos utilizado é o caso–controle. Tal metodologia apresenta como problema obter a referências sem apresentar viés, pois a vigilância não representa a população doente, o que não permite comparação com a população total, conforme demonstrado em **Figura 2**.

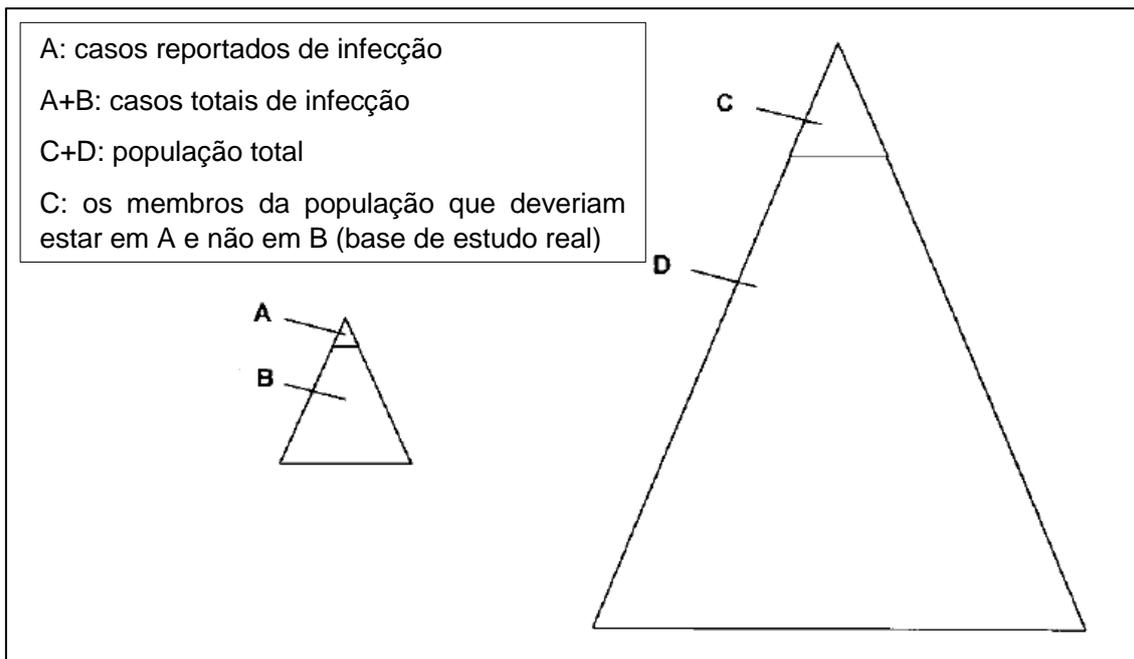


Figura 2. Diagrama demonstrando o viés do estudo caso- controle em estudos com base em sistemas de vigiância (adaptado de McCathry & Giesecke⁵⁵).

Os estudos de “casos-somente” (*case-only*) são alternativas aos caso-controle tradicionais, em situações nas quais a seleção de “grupo-controle” tem grande possibilidade de causar vieses não diferenciais, devido ao desconhecimento da totalidade de “não-casos”.⁵⁵ Esse delineamento é descrito no Dicionário da *International Epidemiology Association* (6ª edição)⁵⁶ como “um tipo de estudo no qual casos são os únicos sujeitos usados para estimar ou testar hipóteses sobre efeitos (por exemplo, casos da doença de interesse); assim, ele não usa um grupo de comparação independente para referência. Variantes incluem o caso-caso, o *case-crossover*, os delineamentos caso-especulares e mesmo as séries de caso (...).” Essa edição, a mais recente, não traz o verbete para “caso-caso”. Na

anterior (5ª. Edição)⁵⁷, porém “case-case study” é definido como “um tipo de estudo no qual casos de uma doença com características específicas são comparados com outros casos da mesma doença mas sem essa característica (...)”. De um modo geral, vemos na literatura o “case-case” às vezes ser apresentado como sinônimo de “case-only”, e em outras interpretado como um subtipo deste delineamento.

Os estudos “caso-caso” surgiram no início dos anos 90, pela necessidade de análise de dados de sistemas de vigilância, e permitem a comparação entre casos de uma mesma doença, mas subtipos de organismos diferentes.⁵⁵ Também são usados para análise de eventos adversos de vacinas⁵⁸ e medicações.^{59,60}

Nas análises realizadas nestes estudos, os casos são auto-igualados, o que elimina fatores de confusão invariantes no tempo e não são utilizadas pessoas não doentes. O *odds ratio* (OR) é um parâmetro casual que mede a interação na escala de risco relativo e não tem uma interpretação estritamente causal. Deve ser usado para estudar interação entre uma variável e um agente.⁶¹

Três de suas principais vantagens incluem^{55,61}:

- Implementação com dados disponíveis de banco de dados;
- Resultados rápidos, o que é essencial quando no âmbito de epidemias e surtos;
- São mais baratos e relativamente simples de realizar.

Os estudos “caso-caso” tem ampla utilização em pesquisas abordando doenças infecciosas.⁵⁵ Alguns exemplos de sua aplicação são citados abaixo:

- Elucidação de aspectos epidemiológicos da infecção por *Campylobacter coli*, em comparação com *Campylobacter jejuni*⁶², e diferenciação dos preditores de aquisição da campilobacteriose em áreas urbanas e rurais.⁶³
- Comparação de fatores associados à infecção por diferentes espécies ou sorotipos de *Salmonella* spp.^{64,65,66}
- Comparação fatores de risco em casos de neoplasia gástrica associada ou não ao vírus de Epstein-Barr.⁶⁷
- Estudar fatores de risco para diferentes agentes etiológicos de diarreia dos viajantes.⁶⁸
- Avaliar a efetividade da vacina contra rotavírus, comparando crianças com diarreia por esse agente com aquelas com isolamento de outro microrganismo.⁶⁹
- Identificar fatores de risco para tuberculose extensamente droga-resistente.⁷⁰
- Identificar determinantes de diagnóstico tardio de infecção pelo HIV/Aids.⁷¹
- Estudar gravidade e prognóstico de infecções por ribotipos do *Clostridium difficile*.^{72,73}

- Diferenciar determinantes de infecção por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) com perfil de suscetibilidade ou resistência à gentamicina.⁷⁴
- Diferenciar fatores de risco para aquisição de *Klesbiella pneumoniae* e *E. coli* produtoras de beta-lactamase de espectro estendido.⁷⁵

Estes são apenas alguns exemplos, e permitem perceber que o delineamento tipo “caso-caso” é adequado para testar diferentes hipóteses e estabelecer critérios de associação e risco. Por essa razão, foi o desenho escolhido para este estudo.

Justificativa do estudo

É uma premissa básica da epidemiologia que alterações no comportamento de uma doença podem ser justificadas por variações na ocorrência de seus determinantes.^{76,77} Assim, tendo anteriormente identificado sazonalidade e determinação meteorológica em ICS causadas por BGN em nosso serviço^{49,50}, em coerência com a literatura recente³³, inferimos que esse fenômeno pode ser dever à variação sazonal dos fatores de risco. Estes são bastante conhecidos (especialmente para microrganismos multidroga-resistentes): demografia, comorbidades, procedimentos e dispositivos invasivos, imunossupressão, uso de antimicrobianos, exposição prolongado ao ambiente de cuidado à saúde.^{78,79,80}

A base racional do nosso estudo é, portanto, a de que esses fatores de risco podem apresentar variação de ocorrência/intensidade entre diferentes estações ou diferentes BGN. Identificar essas variações pode trazer pistas sobre os fenômenos subjacentes à sazonalidade, e sobre como manejá-los para prevenir e/ou controlar os “picos de verão” e outras elevações da incidência associadas à temperatura ambiental.

OBJETIVOS

Objetivos gerais

- Analisar fatores de risco e etiologia de infecções nosocomiais da corrente sanguínea causadas por bacilos Gram-negativos em diferentes estações do ano.
- Analisar impacto da temperatura, umidade e pluviosidade diárias sobre o risco de bacteremias nosocomiais por bacilos Gram-negativos específicos.
- Identificar associação entre estação do ano, variáveis meteorológicas e fatores de risco tradicionais para bacteremias causadas pelos microrganismos de interesse.

Objetivos específicos

- Estudar a associação entre doença de base, comorbidades e bacteremias nosocomiais por bacilos Gram-negativos específicos.
- Analisar impacto da duração da internação e de procedimentos invasivos realizados sobre a incidência de cada um dos microrganismos de interesse.
- Analisar impacto do uso de imunossupressores e antimicrobianos sobre a etiologia das bacteremias nosocomiais.

- Estudar o efeito da estação do ano, da temperatura e umidade médias e pluviosidade total do dia da coleta de hemoculturas sobre a probabilidade de isolar os microrganismos de interesse, em análise simples e após ajuste para as variáveis citadas acima.

Metodologia

METODOLOGIA

Local e período de estudo

O estudo foi conduzido no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HCFMB; **Figura 3**), que está localizado em área periurbana, na cidade de Botucatu, Estado de São Paulo, no Brasil. Os parâmetros de latitude e longitude do HCFMB são: 22°53'21"S, 48°29' 40"W. Ele é um hospital de ensino com 450 leitos, divididos entre Unidades de Terapia Intensiva e unidades de internação clínicas, cirúrgicas e pediátricas.

O hospital inicialmente foi construído para ser um sanatório de tuberculose e, portanto, tem distribuição horizontal das unidades de internação, pronto socorro, UTIs e ambulatórios, com corredores amplos e largos, múltiplas janelas e ventilação externa. As enfermarias, onde estão 90% dos leitos de internação, contam com varandas, sacadas e solários e não há climatização central. As unidades intensivas contam com climatização, porém, muitas vezes é ineficaz.

O hospital conta com Comissão de Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde (CCIRAS) e laboratório de microbiologia próprio, que faz diagnóstico dos microrganismos usando a técnica de espectrometria de massas (Maldi-Tof).⁸¹ **O período total do estudo foi de 01 de julho de 2012 a 30 de junho de 2016.**



Figura 3. Vista aérea do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu.

Delineamento do estudo

Realizamos estudo tipo “caso-caso”, incluindo pacientes com ICS causada por BGN, diagnosticadas entre julho de 2012 e junho de 2016. Em nosso estudo, o desfecho de interesse (caso) foi a ocorrência de ICS nosocomial por bacilos gram-negativos (*Escherichia coli*, *Enterobacter* spp, *Klebsiella* spp, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*). Dois tipos de análise foram feitas: para identificar fatores associados com a ocorrência em diferentes estações ou com o agente etiológico.

Procedimentos Operacionais do Estudo

Foram incluídos no estudo pacientes adultos com hemoculturas positivas para *E. coli*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *P. aeruginosa* e *A. baumannii*. Para determinar origem hospitalar utilizamos a “regra das três meias-noites” (*three midnight rule*), proposta pela *Society of Healthcare Epidemiology of America* (SHEA)⁸²: todas as culturas coletadas com menos de três dias de internação foram eliminadas. Somente a primeira cultura positiva do caso incluído foi considerada. Foi também critério de exclusão a presença de infecção no momento da admissão.

Dados foram coletados em revisão de prontuários médicos e arquivos laboratoriais. Foram levantados dados demográficos, comorbidades (incluindo o Índice de Comorbidades de Charlson)⁸³, procedimentos, uso de imunossupressores, uso de antimicrobianos e sítios de IRAS diagnosticados. Todos esses últimos dados foram coletados apenas durante o “tempo sob risco” (definido como o período entre a internação e a coleta da hemocultura na qual os patógenos foram isolados).

Foram obtidas temperatura, umidade e pluviosidade diárias agregadas no período de 24 horas em observatório meteorológico na Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu (Universidade Estadual Paulista), a qual está na mesma cidade do Hospital que foi realizado o estudo, porém, em diferente bairro. Foram registrados esses dados para a data de isolamento dos patógenos em cada sujeito incluído no estudo.

Análise estatística

Os dados foram descritos em percentuais, proporções, médias e medianas. O teste T de Student foi utilizado para comparar as médias das variáveis meteorológicas das datas de isolamento dos patógenos e do período como um todo.

Na etapa analítica do estudo foram utilizados modelos de regressão logística politômica (multinomial) univariada e multivariada. Esses modelos analisam fatores preditores para desfechos com três ou mais categorias (ditos "defechos politômicos"), enquadrando os desfechos em uma única equação de regressão. Essa técnica tem uso crescente na literatura.^{84,85,86}

Resumidamente, duas análises foram feitas. Na primeira delas, estudamos fatores associados com a aquisição de ICS-BGN em diferentes estações (tendo o inverno como categoria de referência). Na segunda, foram avaliados preditores de ICS-BGN causadas por diferentes patógenos (categoria de referência, *E. coli*). Esta foi similar à anterior, com a diferença de que nós incluímos os parâmetros meteorológicos entre as variáveis. Tais parâmetros não foram utilizados na análise de preditores de estação por serem colineares com o desfecho.

Variáveis foram selecionadas para modelos multivariados em estratégia de avanços (*stepwise forward*) por critério de p-valor, sendo este <0,05 para entrada e <0,1 para permanência nos modelos.⁸⁷ No entanto, em coerência com recomendações da *Infectious Diseases Society of America* (IDSA)⁸⁸, nós

forçamos uma variável de gravidade (Score de Charlson) e outra de exposição (“tempo sob risco”) em todos os modelos.

Todos os procedimentos estatísticos foram realizados nos *softwares* EPI INFO 7 (*Centers for Diseases Control and Prevention, Atlanta, GA, USA*) e SPSS 20 (*IBM, Armonk, NY, USA*).

Resultados

RESULTADOS

Ao total foram analisados 446 casos de pacientes com cultura de sangue positiva para *E. coli*, *Enterobacter spp.*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e *Klebsiella spp.*, no período de julho de 2012 a agosto de 2016, conforme distribuição vista na **Figura 4**.

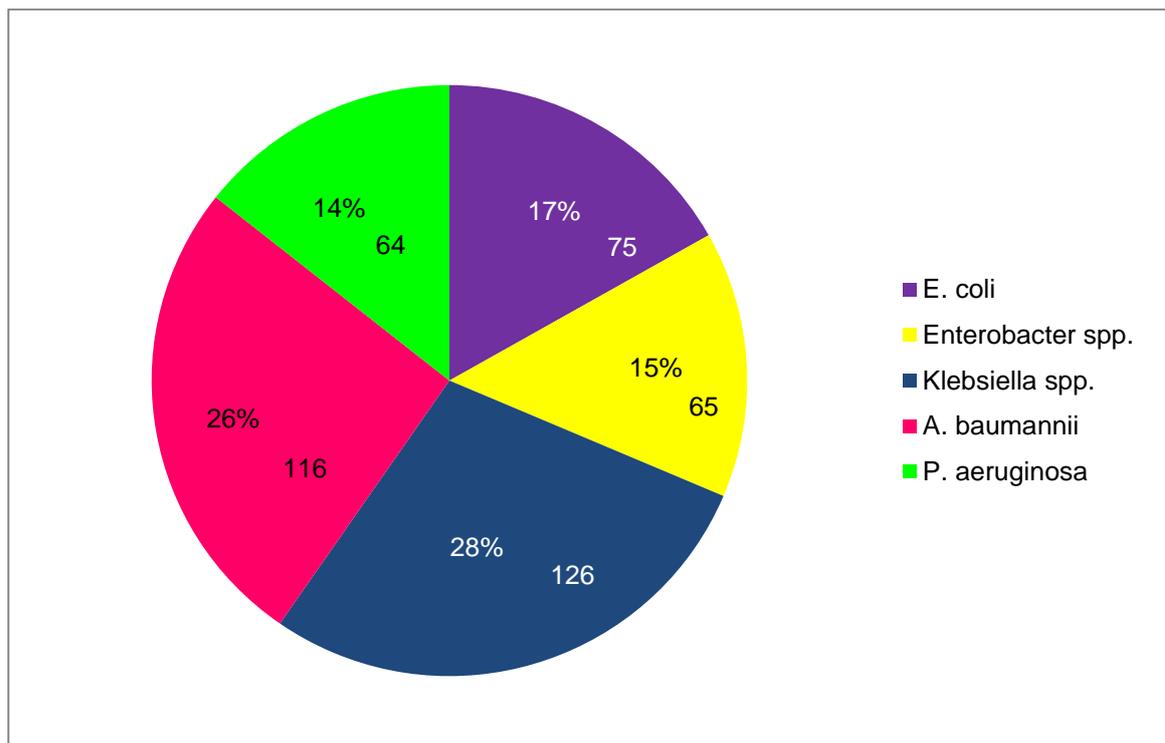


Figura 4. Distribuição de patógenos do estudo em números totais e porcentagens.

Em uma primeira etapa de análise descritiva, estudamos a distribuição de patógenos por estação do ano. Nessa etapa (**Figura 5**) encontramos

maior número de *Klebsiella spp.* ($p=0,01$) e de *Acinetobacter baumannii* ($p=0,05$) no verão em comparação com o inverno.

Continuando a análise, visando compararmos os patógenos por isolados conforme quartis de temperatura no dia do diagnóstico (**Figura 6**), visto que é sabido que as estações no Brasil não são bem definidas. Nesta segunda avaliação, pudemos observar um aumento progressivo da proporção de *A. baumannii* ($p<0,001$) e *Klebsiella spp.* ($p=0,04$).

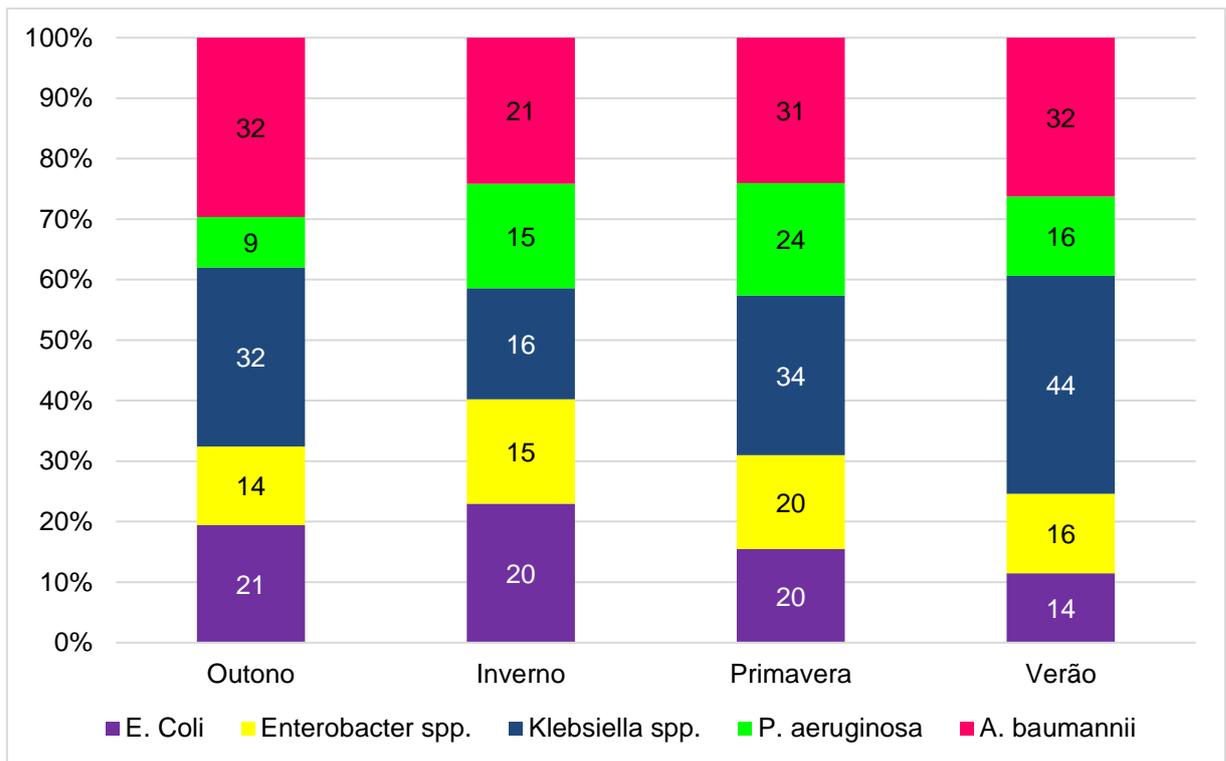


Figura 5. Distribuição dos bacilos Gram-negativos por estação do ano (número no interior das barras, porcentagem no eixo vertical).

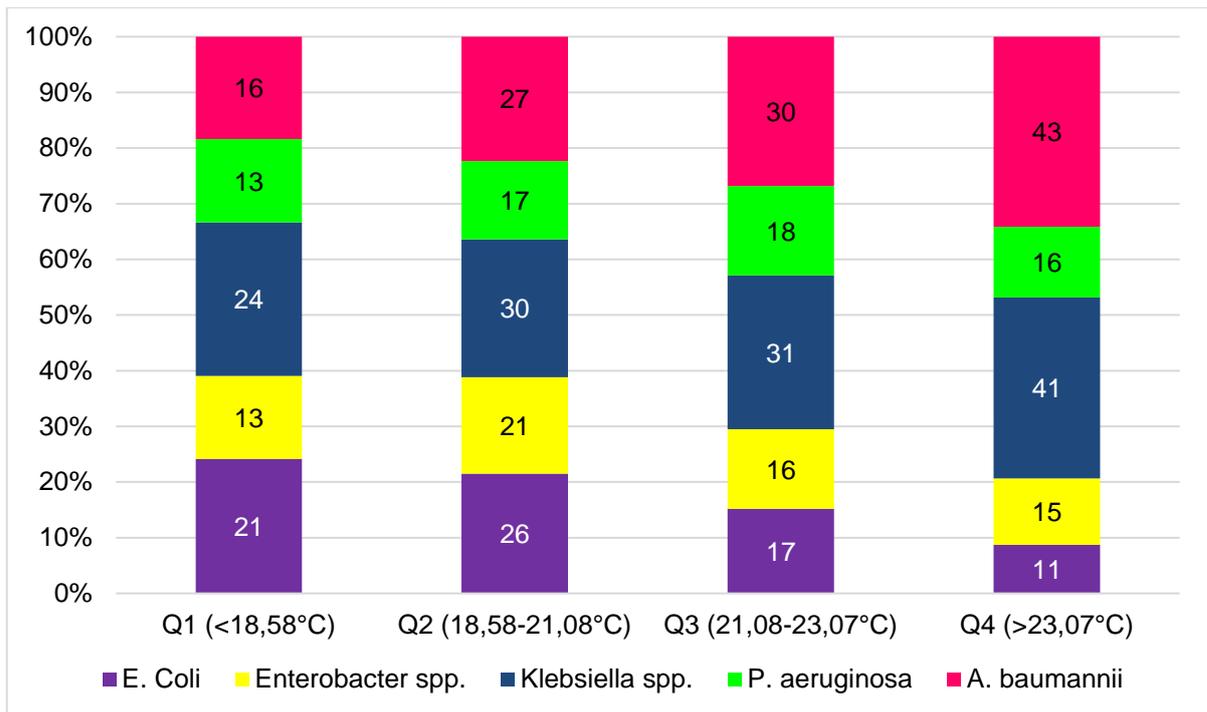


Figura 6. Distribuição dos bacilos Gram-negativos por quartis de temperatura média do dia do diagnóstico (número no interior das barras, porcentagem no eixo vertical).

A **Tabela 1** mostra uma comparação entre a temperatura média nos dias da coleta das hemoculturas e a média geral do parâmetro para o período do estudo (julho/2012-junho/2016). Já as **Tabelas 2 e 3** mostram a mesma análise para realizada umidade e pluviosidade, respectivamente. Nestas não identificamos nenhuma diferença significativa.

Tabela 1. Comparação da temperatura média diária externa nos dias de coleta das hemoculturas analisadas para cada patógeno com a temperatura média do período.

Grupo	Número	T°C	DesvPad	p*
Meteorologia	1461	20,73	3,43	Referência
BGN totais	446	21,23	3,28	0,01
<i>E. coli</i>	75	20,24	3,43	0,22
<i>Enterobacter spp.</i>	65	20,77	3,08	0,94
<i>Klebsiella spp.</i>	126	21,50	3,37	0,04
<i>P. aeruginosa</i>	64	21,11	3,11	0,40
<i>A. baumannii</i>	116	21,92	3,12	<0,001

Obs.: Dados significativos são mostrados em negrito.

* Teste T de Student, bi caudal DesvPad: desvio – padrão, BGN: bacilos gram – negativos.

Tabela 1. Comparação da umidade média diária externa nos dias das coletas das hemoculturas analisadas para cada patógeno com a umidade média do período.

Grupo	Número	U%	DesvPad	p*
Meteorologia	1461	73,87	14,00	Referência
BGN totais	446	73,91	13,77	0,96
<i>E. coli</i>	75	73,74	12,48	0,94
<i>Enterobacter spp.</i>	65	72,99	14,72	0,62
<i>Klebsiella spp.</i>	126	75,89	14,61	0,10
<i>P. aeruginosa</i>	64	74,35	13,70	0,79
<i>A. baumannii</i>	116	72,13	13,03	0,20

* Teste T de Student, bi caudal DesvPad: desvio – padrão, BGN: bacilos gram – negativos

Tabela 2. Comparação da pluviosidade média diária externa nos dias das coletas das hemoculturas analisadas para cada patógeno com a pluviosidade média do período.

Grupo	Número	mm	DesvPad	P*
Meteorologia	1461	4,12	11,03	Referência
BGN totais	446	4,49	11,44	0,54
<i>E. coli</i>	75	3,79	10,75	0,80
<i>Enterobacter spp.</i>	65	3,30	7,81	0,55
<i>Klebsiella spp.</i>	126	5,44	14,27	0,21
<i>P. aeruginosa</i>	64	6,26	13,01	0,13
<i>A. baumannii</i>	116	4,54	10,63	0,69

* Teste T de Student, bi caudal DesvPad: desvio – padrão, BGN: bacilos gram – negativos

A análise de preditores de aquisição de ICS-BGN em diferentes estações do ano é mostrada nas **Tabelas 4** (univariada) e **5** (multivariada). Nesta última, identificamos que *Klebsiella spp.* e *A. baumannii* tiveram maior probabilidade de envolvimento na etiologia de ICS-BGN no verão. Também houve associação entre *Klebsiella spp.* e primavera. Finalmente, houve outras associações significantes, com neutropenia (menos comum no inverno) e uso de linezolida ou cefalosporinas de 1ª./2ª. gerações (predominando no inverno).

Quando, por outro lado, realizamos análise uni e multivariada de preditores para diferentes patógenos (**Tabelas 6 e 7**), identificamos que temperaturas médias diárias mais elevadas estavam associadas ao isolamento de *A. baumannii* e *Klebsiella spp.* Outras associações

identificadas incluíram: umidade relativa e *Klebsiella* spp.; internação em UTI e todos os patógenos (em comparação com *E. coli*); uso de carbapenems e *A. baumannii*.

Tabela 4. Análise univariada (regressão logística multinomial) de fatores associados a infecção da corrente sanguínea causada por bacilos Gram-negativos em diferentes estações do ano.

Fatores	Inverno (87)	Primavera (129)	Verão (122)	Outono (108)
Microrganismos				
<i>E. coli</i> (referência)	20 (23,0)	20 (15,5)	14 (11,5)	21 (19,4)
<i>Enterobacter</i> spp.	15 (23,1)	20 (15,5)	16 (13,1)	14 (13,0)
<i>Klebsiella</i> spp.	16 (18,4)	34 (26,4)	44 (36,1)**	32 (29,6)
<i>P. aeruginosa</i>	15 (17,2)	24 (18,6)	16 (13,1)	9 (8,3)
<i>A. baumannii</i>	21 (24,1)	31 (24,0)	32 (26,2)	32 (29,6)
Dados demográficos				
Sexo feminino	38 (43,7)	59 (45,7)	54 (44,3)	40 (37,0)
Idade, mediana (quartis)	60 (50-74)	57 (50-71)	64 (51-74)	63 (53-73)
Comorbidades				
Doença Cardíaca	20 (23,0)	46 (35,7)*	33 (27,0)	30 (30,6)
Doença Pulmonar	12 (13,8)	18 (14,0)	18 (14,8)	13 (12,0)
Doença Renal	18 (20,7)	32 (24,8)	26 (21,3)	32 (29,6)
Doença Hepática	10 (11,5)	15 (11,6)	13 (10,7)	8 (7,4)

Diabetes mellitus	22 (25,3)	37 (28,7)	33 (27,0)	32 (29,6)
Doença do Sistema Nervoso Central	22 (25,3)	28 (21,7)	36 (29,5)	25 (23,1)
Neoplasia (sólida)	18 (20,7)	20 (15,5)	21 (17,2)	21 (19,4)
Neoplasia (hematológica)	2 (2,3)	10 (7,8)	11 (9,0)	5 (4,6)
Aids	0 (0,0)	5 (3,8)	6 (4,9)	3 (2,8)
Trauma	6 (6,9)	10 (7,8)	11 (9,0)	5 (4,6)
Score de Charlson, mediana (quartis)	2 (1-4)	3 (1-4)	2 (1-4)	3 (1-5)
<i>Dados da internação</i>				
Tempo sob risco, mediana (quartis)	13 (8-85)	12 (7-22)	13 (8-23)	16 (9-23)
Internação em UTI	42 (51,2)	66 (51,6)	48 (40,7)	53 (51,5)
Cirurgia	57 (65,5)	62 (48,1)*	62 (50,8)*	56 (51,9)
Drenos	33 (37,9)	36 (27,9)	33 (27,0)	30 (27,8)
Hemodiálise	12 (13,8)	22 (17,1)	16 (13,1)	18 (16,7)
Sonda Vesical de Demora	69 (79,3)	88 (68,2)	84 (68,9)	79 (73,1)
Ventilação Mecânica	42 (48,3)	56 (43,4)	49 (40,2)	52 (48,1)
Cateter Venoso Central	64 (73,6)	91 (70,5)	83 (68,0)	69 (63,9)
Nutrição parenteral	8 (9,2)	11 (8,5)	8 (6,6)	7 (6,5)
Sonda Nasoenteral	59 (67,8)	72 (55,8)	64 (52,5)*	67 (62,0)
Uso de esteróides	21 (24,5)	39 (30,2)	37 (30,3)	34 (31,5)
Quimioterapia antineoplásica	3 (3,4)	9 (7,0)	14 (11,4)*	16 (14,8)*

Outros agentes imunossupressores	8 (9,2)	10 (7,8)	8 (6,6)	5 (4,6)
Neutropenia	2 (2,3)	12 (9,3)	12 (9,8)*	8 (7,4)
Úlcera de pressão	20 (23,0)	24 (18,6)	31 (25,4)	42 (38,9)*
<i>Uso de antimicrobianos</i>				
Penicilinas	2 (2,3)	7 (5,4)	3 (3,3)	4 (3,7)
Penicilinas com Inibidores de B-lactamase	25 (28,7)	40 (31,0)	37 (30,3)	35 (32,4)
Cefalosporinas, 1ª/2ª gerações	31 (35,6)	24 (18,6)**	29 (23,8)	14 (13,0)**
Cefalosporinas, 3ª/4ª gerações	20 (23,0)	28 (21,7)	31 (25,4)	35 (32,4)
Carbapenêmicos	25 (28,7)	32 (24,8)	32 (26,2)	36 (33,3)
Polimixinas	12 (13,8)	8 (6,2)	8 (6,6)	11 (10,2)
Quinolonas	15 (17,2)	22 (17,1)	27 (22,1)	26 (24,1)
Vancomicina	24 (27,6)	32 (24,8)	28 (23,0)	34 (31,5)
Linezolida	6 (6,9)	1 (0,8)*	1 (0,8)*	2 (1,9)
Macrolídeos	11 (12,6)	12 (9,3)	11 (9,0)	9 (8,3)
Anaerobicidas	16 (18,4)	23 (17,8)	22 (18,0)	23 (21,3)
Trimetoprim/Sulfametoxazol	4 (4,6)	8 (6,2)	8 (7,4)	10 (8,2)
Número de antimicrobianos, mediana (quartis)	2 (1-4)	1 (0-3)	2 (1-3)	2 (1-4)
<i>Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde</i>				
Corrente sanguínea associada a cateter	64 (73,6)	91 (70,5)	83 (68,0)	69 (63,9)
Trato Urinário associada a sonda vesical	27 (31,0)	33 (25,8)	37(30,3)	32 (39,8)

Pneumonia (não associada à ventilação)	11 (12,6)	21 (16,3)	16 (13,1)	12 (11,1)
Pneumonia associada à ventilação	19 (21,8)	18 (14,0)	27 (22,1)	22 (21,3)
Sítio Cirúrgico	9 (10,3)	13 (10,1)	12 (9,8)	11 (10,2)
Pele/Partes Moles	8 (9,2)	5 (3,9)	7 (5,7)	6 (5,6)
Outras	6 (6,9)	9 (7,0)	11 (9,0)	6 (5,6)
Múltiplas	38 (43,7)	50 (38,8)	44 (36,1)	44 (49,7)

Obs.: Dados em número (%), exceto quando especificado. O inverno é a categoria de referência. *p<0,05; **p<0,01.

Tabela 5. Modelo final da análise multivariada (regressão logística multinomial) de fatores associados a infecção da corrente sanguínea causada por bacilos Gram-negativos em diferentes estações do ano.

Fatores	OR (IC95%)		
	Primavera	Verão	Outono
<i>Microrganismos</i>			
<i>E. coli</i> (referência)
<i>Enterobacter spp.</i>	1,78 (0,68-4,71)	2,09 (0,73-5,89)	0,89 (0,31-2,54)
<i>Klebsiella spp.</i>	2,86 (1,14-7,18)*	5,33 (2,04-13,96)**	2,17 (0,85-5,52)
<i>P. aeruginosa</i>	2,35 (0,88-6,26)	2,22 (0,77-6,43)	0,63 (0,20-1,94)
<i>A. baumannii</i>	1,89 (0,77-4,62)	2,69 (1,04-6,96)*	1,32 (0,53-3,30)
<i>Outros fatores</i>			
Score de Charlson	1,05 (0,92-1,19)	1,03 (0,91-1,18)	1,07 (0,94-1,22)
Tempo sob risco	0,99 (0,97-1,01)	0,99 (0,97-1,01)	0,99 (0,97-1,01)
Neutropenia	6,40 (1,12-36,55)*	7,93 (1,34-45,63)*	4,39 (0,74-25,97)
Úlcera de pressão	0,95 (0,43-2,13)	1,49 (0,68-3,28)	2,81 (1,28-6,16)*
Uso de cefalosporinas, 1 ^a /2 ^a	0,43 (0,22-0,83)*	0,66 (0,34-1,25)	0,29 (0,13-0,62)**
Uso de linezolida	0,06 (0,01-0,66)*	0,06 (0,01-0,61)*	0,13 (0,02-0,85)*

Nota. O inverno é a categoria de referência. OR, Odds Ratio. IC, Intervalo de Confiança. *p<0,05; **p<0,01.

Tabela 6. Análise univariada (regressão logística multinomial) de fatores associados a infecção da corrente sanguínea causada por diferentes bacilos Gram-negativos.

Fatores	<i>E. coli</i> (75)	<i>Enterobacter</i> spp. (65)	<i>Klebsiella</i> spp. (126)	<i>P. aeruginosa</i> (64)	<i>A. baumannii</i> (116)
Meteorologia					
Temperatura, mediana (quartis)	20,7 (17,6-22,4)	20,7 (19,1-22,9)	21,5 (19,3-23,8)**	21,6 (19,1-23,3)	22,0 (20,0-24,0)**
Umidade %, mediana (quartis)	75,2 (65,3-81,8)	75,3 (63,7-82,7)	76,9 (68,3-87,4)	74,8 (65,9-82,5)	75,0 (66,5-80,9)
Pluviosidade mm, mediana (quartis)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-1,4)	0,0 (0,0-4,73)	0,0 (0,0-8,97)	0,0 (0,0-4,9)
Estações					
Inverno (referência)	20 (26,7)	15 (23,1)	16 (12,7)	15 (23,4)	21 (18,1)
Primavera	20 (25,6,7)	20 (30,8)	34 (27,0)	24 (37,5)	31 (26,7)
Verão	14 (18,7)	16 (24,6)	44 (34,9)**	16 (25,0)	32 (27,6)
Outono	21 (28,0)	14 (21,5)	32 (25,4)	9 (14,1)	32 (27,6)
Dados demográficos					
Sexo feminino	32 (42,7)	27 (41,5)	54 (42,9)	27 (42,2)	51 (44,0)
Idade, mediana (quartis)	64 (54-74)	62 (52-74)	63 (50-74)	59 (47-74)	62 (47-72)
Comorbidades					
Doença Cardíaca	22 (29,3)	21 (32,3)	36 (28,6)	19 (29,7)	34 (29,3)
Doença Pulmonar	10 (13,3)	8 (12,3)	21 (16,7)	9 (14,1)	13 (11,2)

Doença Renal	9 (12,0)	19 (29,2)*	37 (29,4)**	11 (17,2)	32 (27,6)*
Doença Hepática	14 (18,7)	5 (7,7)	14 (11,1)	5 (7,8)	8 (6,9)*
Diabetes mellitus	22 (29,3)	15 (23,1)	34 (27,0)	14 (2,19)	39 (33,6)
Doença do Sistema Nervoso Central	16 (21,3)	17 (26,2)	25 (19,8)	21 (23,8)	32 (27,6)
Neoplasia (sólida)	22 (29,3)	12 (18,5)	25 (19,8)	8 (12,5)	13 (11,2)
Neoplasia (hematológica)	3 (4,0)	2 (3,1)	7 (5,6)	4 (6,2)	12 (10,3)
Aids	4 (5,3)	1 (1,5)	2 (1,6)	4 (6,2)	3 (2,6)
Trauma	4 (5,3)	5 (7,7)	4 (3,2)	4 (6,2)	16 (13,8)
Score de Charlson, mediana (quartis)	3 (1-6)	2 (1-4)*	3 (1-4)	2 (1-4)	3 (1-4)
<i>Dados da internação</i>					
Tempo sob risco, mediana (quartis)	10 (6-16)	13 (8-27)**	15 (8-25)**	16 (8-29)***	14 (9-23)**
Internação em UTI	19 (26,4)	26 (41,3)	54 (44,6)*	42 (66,7)***	68 (60,7)***
Cirurgia	36 (48,0)	41 (63,1)	59 (46,8)	40 (62,5)	61 (52,7)
Drenos	20(60,7)	21 (32,3)	37 (29,4)	22 (34,4)	32 (26,7)
Hemodiálise	4 (5,3)	8 (12,3)	28 (22,2)**	7 (10,9)	21 (18,5)*
Sonda Vesical de Demora	47 (62,7)	39 (60,0)	84 (66,7)	48 (75,0)	102 (87,9)***
Ventilação Mecânica	21 (28,0)	23 (35,4)	45 (35,7)	38 (59,4)***	72 (62,1)***
Cateter Venoso Central	39 (52,0)	50 (76,9)**	85 (67,5)8	48 (75,0)**	85 (73,3)**
Nutrição parenteral	5 (6,7)	7 (10,8)	11 (8,7)	4 (6,3)	7 (6,0)

Sonda Nasoenteral	31 (41,3)	32 (49,2)	67 (53,2)	48 (75,0)***	84 (72,4)***
Uso de esteróides	12 (16,0)	14 (21,8)	44 (34,9)**	25 (39,1)**	36 (31,0)*
Quimioterapia antineoplásica	9 (12,0)	5 (7,7)	15 (11,9)	4 (6,2)	9 (7,8)
Outros agentes imunossupressores	1 (1,3)	3 (4,6)	17 (13,5)*	6 (9,4)	4 (3,4)
Neutropenia	8 (10,7)	2 (3,1)	8 (6,3)	4 (6,2)	12 (10,3)
Úlcera de pressão	8 (10,7)	15 (23,1)	27 (21,4)	23 (35,9)**	44 (37,9)***
<i>Uso de antimicrobianos</i>					
Penicilinas	2 (2,7)	0 (0,0)	6 (4,8)	2 (3,1)	7 (6,0)
Penicilinas com Inibidores de B-lactamase	12 (16,0)	19 (29,2)	33 (26,2)	26 (40,6)**	47 (40,5)**
Cefalosporinas, 1^a/2^a gerações	16 (21,3)	20 (30,8)	24 (19,0)	19 (29,7)	19 (16,4)
Cefalosporinas, 3^a/4^a gerações	12 (16,0)	10 (8,8)	31 (24,6)	15 (23,4)	46 (39,7)**
Carbapenêmicos	4 (5,3)	12 (18,5)*	31 (24,6)**	21 (32,8)***	57 (49,1)***
Polimixinas	2 (2,7)	7 (10,8)	7 (5,6)	10 (15,6)*	13 (11,8)*
Quinolonas	18 (24,0)	6 (9,2)*	227 (21,4)	9 (14,1)	30 (25,9)
Vancomicina	7 (9,3)	11 (16,9)	26 (20,6)*	21 (32,8)**	53 (45,7)***
Linezolida	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,8)	4 (6,2)	5 (4,3)
Macrolídeos	5 (6,7)	6 (9,2)	8 (6,3)	6 (9,4)	18 (15,5)
Anaerobicidas	15 (20,0)	8 (12,3)	17 (13,5)	9 (14,1)	35 (30,2)
Trimetoprim/Sulfametoxazol	6 (8,0)	1 (1,1)	9 (7,1)	4 (6,2)	10 (8,6)

Número de antimicrobianos, mediana (quartis)	1 (0-2)	1 (0-2)	2 (0-3)	2 (1-4)**	3 (2-5)***
<i>Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde</i>					
Corrente sanguínea associada a cateter	39 (52,0)	50 (76,9)**	85 (67,5)8	48 (75,0)**	85 (73,3)**
Trato Urinário associada a sonda vesical	23 (30,7)	17 (26,2)	45 (35,7)	25 (39,1)	30 (25,9)
Pneumonia (não associada à ventilação)	9 (12,0)	6 (9,2)	13 (10,3)	11 (17,2)	21 (18,1)
Pneumonia asosciada à ventilação	5 (6,7)	13 (20,0)*	21 (16,7)*	16 (25,0)**	32 (27,6)**
Sítio Cirúrgico	5 (6,7)	8 (12,3)	11 (8,7)	9 (14,1)	12 (10,3)
Pele/Partes Moles	2 (2,7)	6 (9,2)	5 (4,0)	3 (4,7)	10 (8,6)
Outras	13 (17,3)	2 (3,1)*	11 (8,7)	0 (0,0)**	6 (5,2)**
Múltiplas	16 (21,3)	26 (40,0)*	42 (33,3)	33 (51,6)**	59 (50,9)

Obs.: Dados em número (%), exceto quando especificado. O *E. coli* é a categoria de referência.

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Tabela 7. Modelo final da análise multivariada (regressão logística multinomial) de fatores associados a infecção da corrente sanguínea causada por diferentes bacilos Gram-negativos.

Fatores	OR (IC95%)			
	<i>Enterobacter</i> spp.	<i>Klebsiella</i> spp.	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. baumannii</i>
<i>Meteorologia</i>				
Temperatura (°C)	1,01 (0,90-1,14)	1,19 (1,07-1,33)**	1,10 (0,97-1,25)	1,20 (1,07-1,34)**
Umidade relativa (%)	1,00 (0,97-1,03)	1,04 (1,01-1,07)**	1,02 (0,99-1,05)	1,02 (0,99-1,05)
<i>Outros fatores</i>				
Doença renal	3,98 (1,43-11,08)**	2,09 (0,81-5,39)	1,05 (0,33-3,37)	2,85 (1,09-7,47)*
Score de Charlson	0,78 (0,67-0,92)**	0,91 (0,80-1,04)	0,91 (0,78-1,05)	0,93 (0,81-1,06)
Tempo sob risco	1,05 (1,01-1,09)**	1,04 (1,01-1,07)*	1,03 (1,00-1,07)	0,99 (0,95-1,02)
Internação em UTI	3,16 (1,24-8,09)*	3,10 (1,38-6,94)**	8,35 (3,04-22,91)***	2,46 (1,11-5,45)*
Uso de imunossupressores	1,54 (0,13-18,43)	9,62 (0,80-72,79)	7,98 (0,70-90,49)	0,89 (0,08-10,37)
Uso de carbapenêmicos	1,30 (0,32-5,24)	2,50 (0,72-8,65)	2,92 (0,79-10,83)	12,76 (3,86-42,17)***
Uso de anaerobicidas	0,35 (0,12-0,99)*	0,38 (0,16-0,91)*	0,39 (0,14-1,06)	1,24 (0,56-2,77)

Nota. *E. coli* é a categoria de referência. OR, Odds Ratio. IC, Intervalo de Confiança. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Embora não fizesse parte de nossa proposta principal, analisamos também a resistência aos antimicrobianos aos BGN estudados, demonstrada na **Figura 7**. Como podemos perceber, em nosso hospital, o *A. baumannii*, segundo patógeno mais encontrado no estudo, apresenta o pior perfil de resistência, com 82% de resistência aos carbapenêmicos e ao ciprofloxacino e 86% ao cefepime..

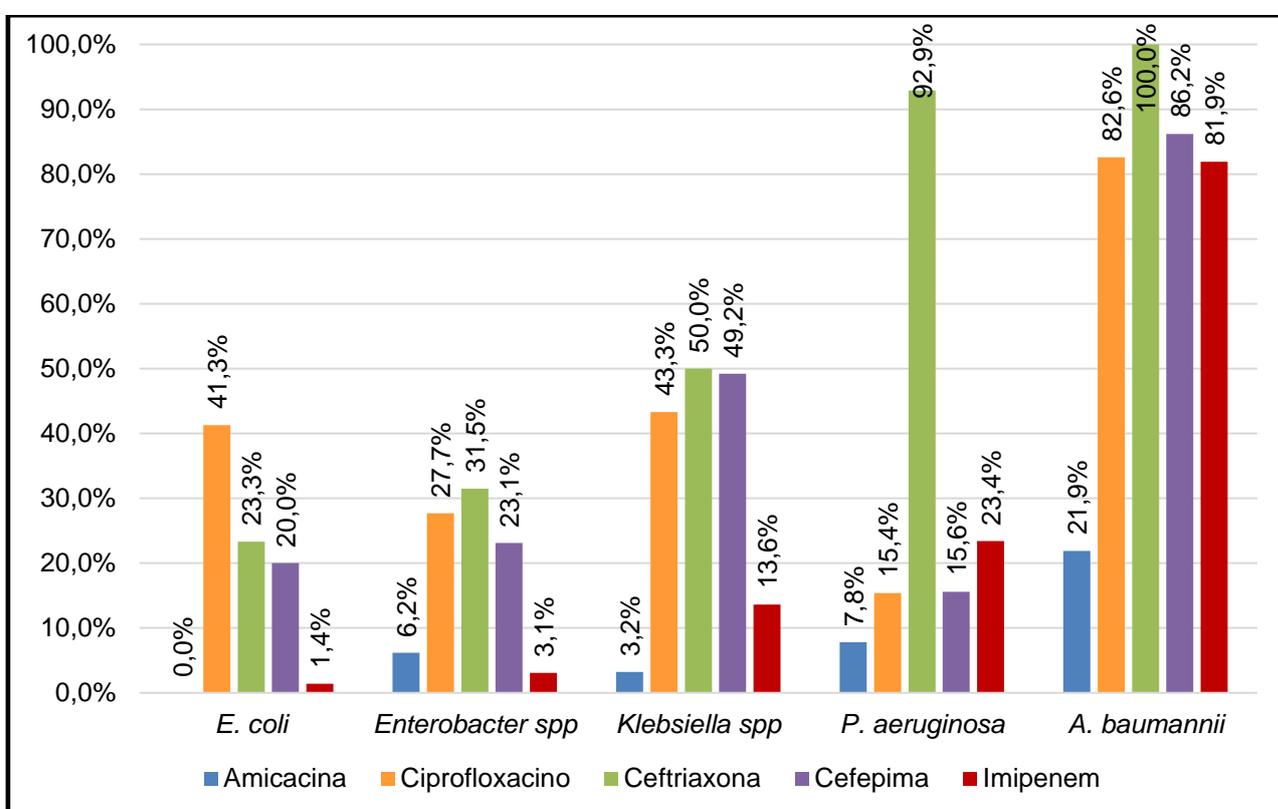


Figura 7. Resistência antimicrobiana (%) apresentada pelos patógenos do estudo.

Artigo científico

Encaminhado ao periódico *Infection Control and Hospital Epidemiology*

Title: Seasons, weather and predictors of healthcare-associated Gram-negative bloodstream infections: a case-only study.

Abbreviated title: Seasons, Weather and GNB-BSI

Authors:

Fernanda Saad Rodrigues¹, MD

Fernanda Avelina Clemente de Luca¹, MD

Antonio Ribeiro da Cunha², PhD

Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza¹, MD, PhD

Authors' affiliations:

¹ Department of Tropical Diseases, Botucatu Medical School, São Paulo State University (UNESP), city of Botucatu, Brazil.

² Faculty of Agronomical Sciences, São Paulo State University (UNESP), city of Botucatu, Brazil.

Corresponding author:

Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza

Departamento de Doenças Tropicais, Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito de Rubião Junior, S/N. ZIP/CEP 18618-970

Botucatu, São Paulo State, Brazil

Word count: 1,671

Abstract

Objective: To analyze the interplay of season, weather and usual predictors of healthcare-associated bloodstream infections caused by Gram-negative bacilli (GNB-BSI).

Design: Retrospective case-only study.

Setting: A teaching hospital with 450 beds in inner Brazil.

Patients: Patients with GNB-BSI caused by *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Pseudomonas aeruginosa* or *Acinetobacter baumannii*.

Methods: The study enrolled 446 subjects with GNB-BSI diagnosed from July 2012 through June 2016. Demographic data, comorbidities, invasive procedures and use of antimicrobials were reviewed in medical charts. The season in which GNB-BSI occurred, as well as weather parameters of the day of diagnosis, were recorded. We analyzed factors associated with occurrence of GNB-BSI in different seasons (with winter as reference category) and caused by different GNB (reference category, *E. coli*). Univariate and multivariable models of multinomial logistic regressions were used for analysis.

Results: In multivariable analysis, GNB-BSI diagnosed in summer were more likely to be caused by *Klebsiella* spp. (OR, 5.33; 95%CI, 2.04-13.96) or *A. baumannii* (OR, 2.69; 95%CI, 1.04-6.96), and there was association of *Klebsiella* spp. and spring (OR, 2.86; 95%CI, 1.14-7.18). Average temperature (in Celsius degrees[°C]) in the day of diagnosis was associated with *Klebsiella* spp. (OR, 1.19; 95%CI, 1.07-1.33) and *A. baumannii* (OR, 1.20; 95%CI, 1.07-1.34).

Conclusion: Warm seasons and daily temperature impact on the etiology of GNB-BSI, even in models adjusted for usual risk factors. Our findings support the thesis that seasonality of healthcare-associated pathogens is intrinsic to microorganisms, and not associated with comorbidities, procedures or use of antimicrobials.

Key-words: Bloodstream infections; Gram-negative; seasonality; weather

Introduction

Seasonality of healthcare-associated infections (HCAIs) caused by Gram-negative bacilli (GNB) has been recently reported.¹ It is usually characterized by “summer peaks” in incidence^{2,3,4,5}, or association with environmental temperature.^{6,7} Coherently, a multicenter study reported increased incidence of GNB bloodstream infections (GNB-BSI) in hospitals located closer to the Equator line.⁸

Factors underlying this phenomenon are still not elucidated. Increase of environmental reservoirs (inside or outside healthcare settings), understaffing associated with summer vacations and expression of virulence factors in GNB have been suggested as contributive causes.^{1,9} Ecological studies, though valuable for identifying seasonality, have not contributed to reinforce either of those hypotheses.

Seasonality in the incidence of healthcare-associated pathogens could reflect seasonal variations in their epidemiological determinants. For some years now, traditional risk factors for healthcare-associated GNB (especially those that are multidrug-resistant) have been repeatedly described.¹⁰ They include severity-of-illness, comorbidities, time of exposure to healthcare (“time at risk”), invasive procedures and use of antimicrobials.^{11,12} It is therefore worth investigating if those factors vary in different seasons, thus contributing to seasonality.

This was the rationale of our study. Briefly, we conducted an observational, individual-based study, aimed at identifying the interplay of season, weather and usual predictors of healthcare-associated GNB-BSI.

Methods

Setting

The study was conducted in a 450-bed teaching hospital in the city of Botucatu, inner São Paulo State, Brazil. The hospital is a reference for tertiary care for several cities in an area comprising one million inhabitants.⁷

Study design

We conducted a case-only study, enrolling subjects with healthcare-associated GNB-BSI diagnosed from July 2012 through June 2016.

Inclusion criteria

We included all adult patients admitted to the hospital who acquired healthcare-associated GNB-BSI caused by *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Pseudomonas aeruginosa* or *Acinetobacter baumannii* during the study period. The diagnosis of healthcare-associated GNB-BSI required that positive blood cultures were collected after three days of admission (“three-midnight rule”), according to the Society for Healthcare Epidemiology of America recommendations.¹³ We excluded all patients who presented infection upon admission. Finally, for subjects who presented more than one GNB in successive blood cultures, only the first culture result was recorded.

Data collection

Data were collected in medical charts and laboratory files. We recorded demographic data and comorbidities, including the Charlson comorbidity score.¹⁴ Other data were collected for the “time at risk”, counted from admission

up to the day of diagnosis of GNB-BSI (i.e., the day of collection of the first blood culture positive for the GNB of interest). Those data included admission to intensive care units (ICU); invasive procedures and devices; use of steroids, anti-neoplastic and other immune-suppressing drugs; and use of antimicrobials. Data were complemented with: (a) the season in which cases were diagnosed; (b) Average temperature (in Celsius degrees [°C]), average relative humidity and rainfall in the day of diagnosis of each GNB-BSI. Those data were collected in a nearby meteorological station (Faculty of Agronomical Sciences, city of Botucatu, Brazil).

Statistical analysis.

Two analyses were performed. In the first, we compared GNB-BSI diagnosed in different seasons. Cases diagnosed in winter were used as reference category. Models of polytomous (multinomial) logistic regression were used for both univariate and multivariable analysis.¹⁵ In the multivariable step, we used a stepwise forward strategy, using criteria of $P < .05$ and $P > 0.1$ for insertion and removal of variables.¹⁶ However, according to recommendations from the Infectious Diseases Society of America (IDSA)¹⁷, we forced “time at risk” and the Charlson comorbidity index in all models.

In the second analysis we compared GNB-BSI caused by different GNB, using *E. coli* as reference category. The analysis was generally similar, except that in this phase we included weather parameters (temperature, humidity and rainfall) among study variables. Both analyses were performed using SPSS 20 (IBM, Armonk, NY).

Ethical issues

This study was approved by the local Committee for Ethics in Research.

Results

Our study enrolled 446 subjects, with GNB-BSI caused by the following microorganisms: *E. coli*, 75; *Enterobacter* spp., 65; *Klebsiella* spp., 126; *P. aeruginosa*, 64; *A. baumannii*, 116. Central-line associated BSI (CLABSI) accounted for 68.8% of cases. Overall cases were more frequent in summer (27.4%) and spring (28.9%) than in winter (19.5%) and fall (24.2%). **Table 1** presents a description meteorological data from the days of collection of positive blood cultures, with reference to overall parameters.

Univariate and multivariable analyses of factors associated to diagnosis of GNB-BSI in different seasons are presented in **Tables 2** and **3**. In multivariable analysis, we found that *Klebsiella* spp. and *A. baumannii* were more likely to be involved in the etiology of GNB-BSI during summer. There was also association of *Klebsiella* spp. and spring. Finally, we identified minor associations of seasons with other variables, such as neutropenia (less likely to occur in winter) and the use of linezolid or 1st/2nd generation cephalosporins (greater during winter).

When, in turn, we used univariate and multivariable models to analyze predictors of different pathogens (**Tables 4** and **5**), we found that higher average temperature (°C) in the day of diagnosis was associated with *Klebsiella* spp. and *A. baumannii*. Other relevant associations included: greater relative

humidity and *Klebsiella* spp.; admission to ICU and all pathogens (in comparison to *E. coli*); and use of carbapenems and *A. baumannii*.

Discussion

Seasonality of infectious diseases is a complex phenomenon whose determinants are still partly obscure.¹⁸ The impact of seasons and climate on parasite-host systems is relatively easy to understand for vector-borne diseases, but not as clear for human-to-human transmission of pathogens (such as occurs in HCAs).¹⁹ Even so, understanding the mechanisms and pattern of seasonality may provide clues on how and when control measures should be applied. The outstanding example is the promotion of yearly influenza vaccine campaigns during fall.²⁰ Therefore, seasonality of healthcare-associated infections should not be interpreted as a mere curiosity, but rather point out to opportunities for prevention and control. This is especially relevant if we consider that working processes (e.g., surgical activity, admission of new trainees in teaching hospitals) in healthcare settings may present seasonal variations.

Given previous evidence of seasonality of GNB-BSI, our study focused on identifying variations of risk factors and etiologic agents among different seasons. Risk factors presented a rather stable pattern of occurrence all over the year. Minor differences, such as greater use of cephalosporins in winter, might reflect seasonal variation in the intensity of surgical activities in the hospital, since those antimicrobials are often used for surgical prophylaxis. Others (e.g., neutropenia more common in warm months) are puzzling,

although greater use of linezolid during winter might be an indirect marker of seasonality of infections caused by vancomycin-resistant enterococci. This finding requires further investigation.

On the other hand, the “summer peaks” of *Klebsiella* spp. and *A. baumannii* were consistent. This is coherent with previous reports.^{4,7} Those microorganisms were also associated with greater environmental temperature, a finding that was also previously reported.²¹ Interestingly, those associations persisted even after adjustment for specific risk factors for those microorganisms, such as admission to ICU and use of carbapenems. In this respect, it is worth noting that even when we restricted our analysis to patients admitted to the ICUs (which were units with climate control) the association of the outside temperature with *Klebsiella* spp. (Odds ratio [OR], 1.31; 95%Confidence interval [CI], 1.09-1.57; $P=0.004$) and *A. baumannii* (OR, 1.36; 95%CI, 1.13-1.63; $P=0.001$) persisted. Similar results were found when we included only CLABSI cases in the multivariable models.

This phenomenon also impacted on overall antimicrobial resistance in GNB-BSI. Using imipenem as a marker of overall resistance, the proportion of resistant isolates for different pathogens in our study was: *A. baumannii*, 86.2%; *P. aeruginosa*, 23.4%; *Klebsiella* spp., 13.6%; *Enterobacter* spp., 3.1% and *E. coli*, 1.4%. Thus, for instance, the predominance of *A. baumannii* in summer and/or in warmer days was associated with a rise in imipenem resistance, with implications for therapy and outcome of affected patients.²² It is worth noting that temperature in the day of diagnosis was significantly associated with overall imipenem resistance (in logistic regression, $P=0.006$).

Two aspects from our study must be emphasized. First, it was conducted in a hospital located in a tropical area. This is interesting, since most studies on seasonality of HCAs and GNB were conducted in countries of temperate climate.¹ In the tropics, variations of weather (temperature, humidity) between different seasons is tenuous, when compared to that observed in temperate areas. Summer is warm and rainy, while a moderate fall in temperature and humidity occurs during winter. Therefore, the association of warmer seasons and higher temperatures with specific GNB seems to be valid for most latitudes.

A second aspect concerns the overall patterns of demography, comorbidities and procedures among study subjects. They were rather old (median age, 62), with several comorbidities (median Charlson score, 3). Almost half of them (48.6%) were admitted to ICUs, 39.5% acquired HCAs in two or more sites, and most had invasive devices placed. Finally, 49.8% of them died during admission. Those are common characteristics of GNB-BSI.²³ The fact that risk factors were present at similar rates during different seasons suggests that intrinsic properties of microorganisms (either invasiveness or the ability to survive in environmental reservoirs), rather than changes in health care processes, underlie seasonality.

There are some limitations to our study. First, it was single-centered, and subjects were selected over a relatively small years span. We did not assess the impact of “summer understaffing” on the incidence of GNB-BSI.^{1,9} Also, our study design did not allow us to take in account the possibility of ecological competition between different microorganisms in the hospital setting – a phenomenon that has been reported.²⁴ However, there are also strengths. This is, to our knowledge, the first study to analyze the interplay of traditional

risk factors, seasons and weather parameters in the epidemiology of HCAs. We performed extensive chart review and used rigorous analytic models.

In conclusion, our study identified the impact of seasons and weather on the etiology of GNB-BSI. That impact was independent of demography, comorbidities, invasive procedures or use of antimicrobials. It was detected both in wards with or without climate control. While several doubts remain on the mechanisms underlying seasonality of GNB, our findings reinforce the need of strengthening infection control measures during summer and in warmer periods.

Acknowledgments

All authors state that they have no conflict of interest regarding this study.

FACL participated part of this study while a medical student, with a student grant from the Nacional Council of Scientific and Technological Development (CNPq).

References

1. Richet H. Seasonality in gram-negative and healthcare-associated infections. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:934–940.
2. McDonald LC, Banerjee SN, Jarvis WR, Nosocomial Infections Surveillance System. Seasonal variation of Acinetobacter infections: 1987–1996. *Clin Infect Dis* 1999;29:1133–1137.
3. Perencevich EN, McGregor JC, Shardell M, et al. Summer peaks in the incidences of gram-negative bacterial infection among hospitalized patients. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008;29: 1124–1131.

4. Anderson DJ, Richet H, Chen LF, et al. Seasonal variation in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection on 4 continents. *J Infect Dis* 2008;197:752-6.
5. Kolonitsiou F, Papadimitriou-Olivgeris M, Spiliopoulou A, et al. Trends of Bloodstream Infections in a University Greek Hospital during a Three-Year Period: Incidence of Multidrug-Resistant Bacteria and Seasonality in Gram-negative Predominance. *Pol J Microbiol* 2017;66:171-180.
6. Schwab F, Gastmeier P, Meyer E. The warmer the weather, the more gram-negative bacteria - impact of temperature on clinical isolates in intensive care units. *PLoS One* 2014;9:e91105.
7. Fortaleza CM, Caldeira SM, Moreira RG, et al. Tropical healthcare epidemiology: weather determinants of the etiology of bloodstream infections in a Brazilian hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2014;35:85-8.
8. Fisman D, Patrozou E, Carmeli Y, et al. Geographical variability in the likelihood of bloodstream infections due to gram-negative bacteria: correlation with proximity to the equator and health care expenditure. *PLoS One* 2014;9:e114548.
9. Eber MR, Shardell M, Schweizer ML, Laxminarayan R, Perencevich EN. Seasonal and temperature-associated increases in gram-negative bacterial bloodstream infections among hospitalized patients. *PLoS One* 2011;6:e25298.
10. Safdar N, Maki DG. The commonality of risk factors for nosocomial colonization and infection with antimicrobial-resistant *Staphylococcus*

- aureus*, enterococcus, gram-negative bacilli, *Clostridium difficile*, and *Candida*. *Ann Intern Med* 2002;136:834-44.
11. Falagas ME, Kopterides P. Risk factors for the isolation of multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: a systematic review of the literature. *J Hosp Infect* 2006;64:7-15.
 12. van Loon K, Voor In 't Holt AF, Vos MC. A Systematic Review and Meta-analyses of the Clinical Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 2017;62: e01730-17.
 13. Cohen AL, Calfee D, Fridkin SK, et al. Recommendations for metrics for multidrug-resistant organisms in healthcare settings: SHEA/HICPAC position paper. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008;29:901–913.
 14. Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chronic Dis* 1987;40:373-83.
 15. Biesheuvel CJ, Vergouwe Y, Steyerberg EW, Grobbee DE, Moons KG. Polytomous logistic regression analysis could be applied more often in diagnostic research. *J Clin Epidemiol* 2008;61:125-34.
 16. Greenland S. Modeling and variable selection in epidemiologic analysis. *Am J Public Health* 1989;79:340-9.
 17. Harris AD, Karchmer TB, Carmeli Y, Samore MH. Methodological principles of case-control studies that analyzed risk factors for antibiotic resistance: a systematic review. *Clin Infect Dis* 2001;32:1055-61.
 18. Fisman DN. Seasonality of infectious diseases. *Annu Rev Public Health* 2007;28:127-43.

19. Fisman D. Seasonality of viral infections: mechanisms and unknowns. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:946-54.
20. Altizer S, Dobson A, Hosseini P, Hudson P, Pascual M, Rohani P. Seasonality and the dynamics of infectious diseases. *Ecol Lett* 2006;9:467-84.
21. Caldeira SM, Cunha AR, Akazawa RT, Moreira RG, Souza Ldo R, Fortaleza CM. Weather parameters and nosocomial bloodstream infection: a case-referent study. *Rev Saude Publica* 2015;49:19.
22. Kadri SS, Hohmann SF, Orav EJ, et al. Tracking colistin-treated patients to monitor the incidence and outcome of carbapenem-resistant Gram-negative infections. *Clin Infect Dis* 2015;60:79-87.
23. Ergönül Ö, Aydın M, Azap A, et al. Healthcare-associated Gram-negative bloodstream infections: antibiotic resistance and predictors of mortality. *J Hosp Infect* 2016; 94:381-385.
24. Lastoria LC, Caldeira SM, Moreira RG, Akazawa RT, Maion JC, Fortaleza CM. Ecological competition and the incidence of *Acinetobacter baumannii* bloodstream infections in a teaching hospital in Southeastern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2014;47:583-8.

Table 1. Meteorological data from the days of diagnosis of Gram-negative healthcare-associated bloodstream infections.

Parameter / Pathogen	Average	SD	P
Temperature (°C)			
Overall parameter	20.73	3.43	...
Total GNB	21.23	3.28	.01
<i>E. coli</i>	20.24	3.43	.22
<i>Enterobacter</i> spp.	20.77	3.08	.94
<i>Klebsiella</i> spp.	21.50	3.37	.04
<i>P. aeruginosa</i>	21.11	3.11	.40
<i>A. baumannii</i>	21.92	3.12	<.001
Relative humidity (%)			
Overall parameter	73.87	14.00	...
Total GNB	73.91	13.77	.96
<i>E. coli</i>	73.74	12.48	.94
<i>Enterobacter</i> spp.	72.99	14.72	.62
<i>Klebsiella</i> spp.	75.89	14.61	.10
<i>P. aeruginosa</i>	74.35	13.70	.79
<i>A. baumannii</i>	72.13	13.03	.20
Rainfall (milimeters)			
Overall parameter	4.12	11.03	...
Total GNB	4.49	11.44	.54
<i>E. coli</i>	3.79	10.75	.80
<i>Enterobacter</i> spp.	3.30	7.81	.55
<i>Klebsiella</i> spp.	5.44	14.27	.21
<i>P. aeruginosa</i>	6.26	13.01	.13
<i>A. baumannii</i>	4.54	10.63	.69

Note. We compared groups to the overall parameter (average values for all days in the whole study period) using Student's T test. Significant results ($P < .05$) are presented in boldface.

°C, Celsius degrees; SD, Standard deviation.

Table 2. Descriptive results and univariate analysis (multinomial logistic regression) of factors associated to acquisition of healthcare-associated Gram-negative bloodstream infections in different seasons.

Factors	Winter (87)	Spring (129)	Summer (122)	Fall (108)
Microorganisms				
<i>E. coli</i> (reference)	20 (23.0)	20 (15.5)	14 (11.5)	21 (19.4)
<i>Enterobacter</i> spp.	15 (23.1)	20 (15.5)	16 (13.1)	14 (13.0)
<i>Klebsiella</i> spp.	16 (18.4)	34 (26.4)	44 (36.1) ^b	32 (29.6)
<i>P. aeruginosa</i>	15 (17.2)	24 (18.6)	16 (13.1)	9 (8.3)
<i>A. baumannii</i>	21 (24.1)	31 (24.0)	32 (26.2)	32 (29.6)
Demographic data				
Female gender	38 (43.7)	59 (45.7)	54 (44.3)	40 (37.0)
Age in years, median (quartiles)	60 (50-74)	57 (50-71)	64 (51-74)	63 (53-73)
Comorbidities				
Heart disease	20 (23.0)	46 (35.7) ^a	33 (27.0)	30 (30.6)
Lung disease	12 (13.8)	18 (14.0)	18 (14.8)	13 (12.0)
Renal disease	18 (20.7)	32 (24.8)	26 (21.3)	32 (29.6)
Liver disease	10 (11.5)	15 (11.6)	13 (10.7)	8 (7.4)
Diabetes mellitus	22 (25.3)	37 (28.7)	33 (27.0)	32 (29.6)
Central Nervous System disease	22 (25.3)	28 (21.7)	36 (29.5)	25 (23.1)
Solid malignancy	18 (20.7)	20 (15.5)	21 (17.2)	21 (19.4)
Lymphoma/Leukemia	2 (2.3)	10 (7.8)	11 (9.0)	5 (4.6)
AIDS	0 (0.0)	5 (3.8)	6 (4.9)	3 (2.8)

Trauma	6 (6.9)	10 (7.8)	11 (9.0)	5 (4.6)
Charlson comorbidity score, median (quartiles)	2 (1-4)	3 (1-4)	2 (1-4)	3 (1-5)
Admission data				
Time at risk in days, median (quartiles)	13 (8-85)	12 (7-22)	13 (8-23)	16 (9-23)
Admission to ICU	42 (51.2)	66 (51.6)	48 (40.7)	53 (51.5)
Surgery	57 (65.5)	62 (48.1) ^a	62 (50.8) ^a	56 (51.9)
Placement of drains	33 (37.9)	36 (27.9)	33 (27.0)	30 (27.8)
Hemodialysis	12 (13.8)	22 (17.1)	16 (13.1)	18 (16.7)
Urinary catheter	69 (79.3)	88 (68.2)	84 (68.9)	79 (73.1)
Mechanical ventilation	42 (48.3)	56 (43.4)	49 (40.2)	52 (48.1)
Central venous cateter	64 (73.6)	91 (70.5)	83 (68.0)	69 (63.9)
Parenteral nutrition	8 (9.2)	11 (8.5)	8 (6.6)	7 (6.5)
Nasoenteral tube	59 (67.8)	72 (55.8)	64 (52.5) ^a	67 (62.0)
Use of Streoids	21 (24.5)	39 (30.2)	37 (30.3)	34 (31.5)
Use of antineoplastic drugs	3 (3.4)	9 (7.0)	14 (11.4) ^a	16 (14.8) ^a
Use of other immune-suppressing drugs	8 (9.2)	10 (7.8)	8 (6.6)	5 (4.6)
Neutropenia	2 (2.3)	12 (9.3)	12 (9.8) ^a	8 (7.4)
Pressure ulcer	20 (23.0)	24 (18.6)	31 (25.4)	42 (38.9) ^a
Use of antimicrobials				
Penicillins	2 (2.3)	7 (5.4)	3 (3.3)	4 (3.7)
Penicillins plus beta-lactamase inhibitors	25 (28.7)	40 (31.0)	37 (30.3)	35 (32.4)
Cephalosporins, 1 st /2 nd generations	31 (35.6)	24 (18.6) ^b	29 (23.8)	14 (13.0) ^b
Cephalosporins, 3 rd /4 th generations	20 (23.0)	28 (21.7)	31 (25.4)	35 (32.4)

Carbapenems	25 (28.7)	32 (24.8)	32 (26.2)	36 (33.3)
Polimyxins	12 (13.8)	8 (6.2)	8 (6.6)	11 (10.2)
Quinolones	15 (17.2)	22 (17.1)	27 (22.1)	26 (24.1)
Vancomycin	24 (27.6)	32 (24.8)	28 (23.0)	34 (31.5)
Linezolid	6 (6.9)	1 (0.8) ^a	1 (0.8) ^a	2 (1.9)
Macrolides	11 (12.6)	12 (9.3)	11 (9.0)	9 (8.3)
Anti-anaerobe drugs	16 (18.4)	23 (17.8)	22 (18.0)	23 (21.3)
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	4 (4.6)	8 (6.2)	8 (7.4)	10 (8.2)
Number of antimicrobials used, median (quartiles)	2 (1-4)	1 (0-3)	2 (1-3)	2 (1-4)
Healthcare-associated infections				
Central-line associated bloodstream infection	64 (73.6)	91 (70.5)	83 (68.0)	69 (63.9)
Catheter-associated urinary tract infection	27 (31.0)	33 (25.8)	37(30.3)	32 (39.8)
Pneumonia (non ventilator-associated)	11 (12.6)	21 (16.3)	16 (13.1)	12 (11.1)
Pneumonia (ventilator-associated)	19 (21.8)	18 (14.0)	27 (22.1)	22 (21.3)
Surgical site infection	9 (10.3)	13 (10.1)	12 (9.8)	11 (10.2)
Infection of skin/sof tissues	8 (9.2)	5 (3.9)	7 (5.7)	6 (5.6)
Other healthcare-associated infections	6 (6.9)	9 (7.0)	11 (9.0)	6 (5.6)
Two or more healthcare-associated infections	38 (43.7)	50 (38.8)	44 (36.1)	44 (49.7)

Note. Data in number (%) except when otherwise specified. Winter is the reference category for comparisons. ^a $P < .05$; ^b $P < .01$

ICU, Intensive Care Unit. Anti-anaerobe drugs, clindamycin and metronidazole.

Table 3. Final multivariable model of multinomial logistic regression for acquisition of of healthcare-associated Gram-negative bloodstream infections in different seasons.

Factors	OR (95CI%)		
	Spring	Summer	Fall
Microorganisms			
<i>E. coli</i> (reference)
<i>Enterobacter</i> spp.	1.78 (0.68-4.71)	2.09 (0.73-5.89)	0.89 (0.31-2.54)
<i>Klebsiella</i> spp.	2.86 (1.14-7.18) ^a	5.33 (2.04-13.96) ^b	2.17 (0.85-5.52)
<i>P. aeruginosa</i>	2.35 (0.88-6.26)	2.22 (0.77-6.43)	0.63 (0.20-1.94)
<i>A. baumannii</i>	1.89 (0.77-4.62)	2.69 (1.04-6.96) ^a	1.32 (0.53-3.30)
Other factors			
Charlson comorbidity score	1.05 (0.92-1.19)	1.03 (0.91-1.18)	1.07 (0.94-1.22)
Time at risk	0.99 (0.97-1.01)	0.99 (0.97-1.01)	0.99 (0.97-1.01)
Neutropenia	6.40 (1.12-36.55) ^a	7.93 (1.34-45.63) ^a	4.39 (0.74-25.97)
Pressure ulcer	0.95 (0.43-2.13)	1.49 (0.68-3.28)	2.81 (1.28-6.16) ^a
Use of cephalosporins, 1 st /2 nd generations	0.43 (0.22-0.83) ^a	0.66 (0.34-1.25)	0.29 (0.13-0.62) ^b
Use of linezolid	0.06 (0.01-0.66) ^a	0.06 (0.01-0.61) ^a	0.13 (0.02-0.85) ^a

Note. Winter is the reference category. ^a $P < .05$; ^b $P < .01$

OR, Odds Ratio; CI, Confidence Interval.

Table 4. Descriptive results and univariate analysis (multinomial logistic regression) of factors associated to acquisition of healthcare-associated Gram-negative bloodstream infections caused by different microorganisms.

Fatores	<i>E. coli</i> (75)	<i>Enterobacter</i> spp. (65)	<i>Klebsiella</i> spp. (126)	<i>P. aeruginosa</i> (64)	<i>A. baumannii</i> (116)
<i>Meteorology</i>					
Temperature °C, median (quartiles)	20.7 (17.6-22.4)	20.7 (19.1-22.9)	21.5 (19.3-23.8) ^b	21.6 (19.1-23.3)	22.0 (20.0-24.0) ^b
Humidity %, median (quartiles)	75.2 (65.3-81.8)	75.3 (63.7-82.7)	76.9 (68.3-87.4)	74.8 (65.9-82.5)	75.0 (66.5-80.9)
Rainfall mm, median (quartiles)	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0-1.4)	0.0 (0.0-4.73)	0.0 (0.0-8.97)	0.0 (0.0-4.9)
<i>Seasons</i>					
Winter (reference)	20 (26.7)	15 (23.1)	16 (12.7)	15 (23.4)	21 (18.1)
Spring	20 (256.7)	20 (30.8)	34 (27.0)	24 (37.5)	31 (26.7)
Summer	14 (18.7)	16 (24.6)	44 (34.9) ^b	16 (25.0)	32 (27.6)
Fall	21 (28.0)	14 (21.5)	32 (25.4)	9 (14.1)	32 (27.6)
<i>Demographic data</i>					
Female gender	32 (42.7)	27 (41.5)	54 (42.9)	27 (42.2)	51 (44.0)
Age in years, median (quartiles)	64 (54-74)	62 (52-74)	63 (50-74)	59 (47-74)	62 (47-72)
<i>Comorbidities</i>					
Heart disease	22 (29.3)	21 (32.3)	36 (28.6)	19 (29.7)	34 (29.3)
Lung disease	10 (13.3)	8 (12.3)	21 (16.7)	9 (14.1)	13 (11.2)
Renal disease	9 (12.0)	19 (29.2) ^a	37 (29.4) ^b	11 (17.2)	32 (27.6) ^a
Liver disease	14 (18.7)	5 (7.7)	14 (11.1)	5 (7.8)	8 (6.9) ^a
Diabetes mellitus	22 (29.3)	15 (23.1)	34 (27.0)	14 (2.19)	39 (33.6)
Central Nervous System disease	16 (21.3)	17 (26.2)	25 (19.8)	21 (23.8)	32 (27.6)

Solid malignancy	22 (29.3)	12 (18.5)	25 (19.8)	8 (12.5)	13 (11.2)
Lymphoma/Leukemia	3 (4.0)	2 (3.1)	7 (5.6)	4 (6.2)	12 (10.3)
AIDS	4 (5.3)	1 (1.5)	2 (1.6)	4 (6.2)	3 (2.6)
Trauma	4 (5.3)	5 (7.7)	4 (3.2)	4 (6.2)	16 (13.8)
Charlson comorbidity score, median (quartiles)	3 (1-6)	2 (1-4) ^a	3 (1-4)	2 (1-4)	3 (1-4)
Admission data					
Time at risk in days, median (quartiles)	10 (6-16)	13 (8-27) ^b	15 (8-25) ^b	16 (8-29) ^c	14 (9-23) ^b
Admission to ICU	19 (26.4)	26 (41.3)	54 (44.6) ^a	42 (66.7) ^c	68 (60.7) ^c
Surgery	36 (48.0)	41 (63.1)	59 (46.8)	40 (62.5)	61 (52.7)
Placement of drains	20 (60.7)	21 (32.3)	37 (29.4)	22 (34.4)	32 (26.7)
Hemodialysis	4 (5.3)	8 (12.3)	28 (22.2) ^b	7 (10.9)	21 (18.5) ^a
Urinary catheter	47 (62.7)	39 (60.0)	84 (66.7)	48 (75.0)	102 (87.9) ^c
Mechanical ventilation	21 (28.0)	23 (35.4)	45 (35.7)	38 (59.4) ^c	72 (62.1) ^c
Central venous cateter	39 (52.0)	50 (76.9) ^b	85 (67.5) ⁸	48 (75.0) ^b	85 (73.3) ^b
Parenteral nutrition	5 (6.7)	7 (10.8)	11 (8.7)	4 (6.3)	7 (6.0)
Nasoenteral tube	31 (41.3)	32 (49.2)	67 (53.2)	48 (75.0) ^c	84 (72.4) ^c
Use of steroids	12 (16.0)	14 (21.8)	44 (34.9) ^b	25 (39.1) ^b	36 (31.0) ^a
Use of antineoplastic drugs	9 (12.0)	5 (7.7)	15 (11.9)	4 (6.2)	9 (7.8)
Use of other immune-suppressing drugs	1 (1.3)	3 (4.6)	17 (13.5) ^a	6 (9.4)	4 (3.4)
Neutropenia	8 (10.7)	2 (3.1)	8 (6.3)	4 (6.2)	12 (10.3)
Pressure ulcer	8 (10.7)	15 (23.1)	27 (21.4)	23 (35.9) ^b	44 (37.9) ^c
Use of antimicrobials					

Penicillins	2 (2.7)	0 (0.0)	6 (4.8)	2 (3.1)	7 (6.0)
Penicillins plus beta-lactamase inhibitors	12 (16.0)	19 (29.2)	33 (26.2)	26 (40.6) ^b	47 (40.5) ^b
Cephalosporins, 1 st /2 nd generations	16 (21.3)	20 (30.8)	24 (19.0)	19 (29.7)	19 (16.4)
Cephalosporins, 3 rd /4 th generations	12 (16.0)	10 (8.8)	31 (24.6)	15 (23.4)	46 (39.7) ^b
Carbapenems	4 (5.3)	12 (18.5) ^a	31 (24.6) ^b	21 (32.8) ^c	57 (49.1) ^c
Polimyxins	2 (2.7)	7 (10.8)	7 (5.6)	10 (15.6) ^a	13 (11.8) ^a
Quinolones	18 (24.0)	6 (9.2) ^a	227 (21.4)	9 (14.1)	30 (25.9)
Vancomycin	7 (9.3)	11 (16.9)	26 (20.6) ^a	21 (32.8) ^b	53 (45.7) ^c
Linezolid	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.8)	4 (6.2)	5 (4.3)
Macrolides	5 (6.7)	6 (9.2)	8 (6.3)	6 (9.4)	18 (15.5)
Anti-anaerobe drugs	15 (20.0)	8 (12.3)	17 (13.5)	9 (14.1)	35 (30.2)
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	6 (8.0)	1 (1.1)	9 (7.1)	4 (6.2)	10 (8.6)
Number of antimicrobials used, median (quartiles)	1 (0-2)	1 (0-2)	2 (0-3)	2 (1-4) ^b	3 (2-5) ^c
Healthcare-associated infections					
Central-line associated bloodstream infection	39 (52.0)	50 (76.9) ^b	85 (67.5) ^a	48 (75.0) ^b	85 (73.3) ^b
Catheter-associated urinary tract infection	23 (30.7)	17 (26.2)	45 (35.7)	25 (39.1)	30 (25.9)
Pneumonia (non ventilator-associated)	9 (12.0)	6 (9.2)	13 (10.3)	11 (17.2)	21 (18.1)
Pneumonia (ventilator-associated)	5 (6.7)	13 (20.0) ^a	21 (16.7) ^a	16 (25.0) ^b	32 (27.6) ^b
Surgical site infection	5 (6.7)	8 (12.3)	11 (8.7)	9 (14.1)	12 (10.3)
Infection of skin/sof tissues	2 (2.7)	6 (9.2)	5 (4.0)	3 (4.7)	10 (8.6)
Other healthcare-associated infections	13 (17.3)	2 (3.1) ^a	11 (8.7)	0 (0.0) ^b	6 (5.2) ^b

Two or more healthcare-associated infections	16 (21.3)	26 (40.0) ^a	42 (33.3)	33 (51.6) ^b	59 (50.9) ^b
----------------------------------------------	-----------	------------------------	-----------	------------------------	------------------------

Note. Data in number (%) except when otherwise specified. *E. coli* is the reference category for comparisons. ^a $P < .05$; ^b $P < .01$; ^c $P < .001$

ICU, Intensive Care Unit. Anti-anaerobe drugs, clindamycin and metronidazole.

Table 5. Final multivariable model of multinomial logistic regression for acquisition of of healthcare-associated Gram-negative bloodstream infections caused by different microorganisms.

Factors	OR (IC95%)			
	<i>Enterobacter</i> spp.	<i>Klebsiella</i> spp.	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. baumannii</i>
Meteorology				
Temperature (°C)	1.01 (0.90-1.14)	1.19 (1.07-1.33) ^b	1.10 (0.97-1.25)	1.20 (1.07-1.34) ^b
Relative humidity (%)	1.00 (0.97-1.03)	1.04 (1.01-1.07) ^b	1.02 (0.99-1.05)	1.02 (0.99-1.05)
Other factors				
Renal disease	3.98 (1.43-11.08) ^b	2.09 (0.81-5.39)	1.05 (0.33-3.37)	2.85 (1.09-7.47) ^a
Charlson comorbidity score	0.78 (0.67-0.92) ^b	0.91 (0.80-1.04)	0.91 (0.78-1.05)	0.93 (0.81-1.06)
Time at risk	1.05 (1.01-1.09) ^b	1.04 (1.01-1.07) ^a	1.03 (1.00-1.07)	0.99 (0.95-1.02)
Admission to ICU	3.16 (1.24-8.09) ^a	3.10 (1.38-6.94) ^b	8.35 (3.04-22.91) ^c	2.46 (1.11-5.45) ^a
Use of immune-suppressing drugs	1.54 (0.13-18.43)	9.62 (0.80-72.79)	7.98 (0.70-90.49)	0.89 (0.08-10.37)
Use of carbapenems	1.30 (0.32-5.24)	2.50 (0.72-8.65)	2.92 (0.79-10.83)	12.76 (3.86-42.17) ^c
Use of anti-anaerobe drugs	0.35 (0.12-0.99) ^a	0.38 (0.16-0.91) ^a	0.39 (0.14-1.06)	1.24 (0.56-2.77)

Note. *E. coli* is the reference category. ^a $P < .05$; ^b $P < .01$; ^c $P < .001$

ICU, Intensive Care Unit. Anti-anaerobe drugs, clindamycin and metronidazole.

Discussão

DISCUSSÃO

Embora a percepção de sazonalidade de algumas doenças já apareça nos escritos de Hipócrates², somente em 1929 foram aplicados pela primeira vez métodos estatísticos para estudar esse fenômeno. Naquele caso, a infecção abordada foi o Sarampo.⁴ Já a sazonalidade das IRAS são um tema recente, e seu estudo é ainda prejudicado pelo uso de testes estatísticos sub-ótimos.³³ Métodos mais apropriados, como a análise de séries temporais com modelos ARIMA (*Arithmetic Integrated Moving Average*) de Box-Jenkins⁸⁹ ou autocorrelação temporal tem sido raramente utilizados.⁴⁹

Vale ressaltar que, intrinsecamente ligados ao fenômeno da sazonalidade, estão a dependência meteorológica (associação com valores de temperatura ou umidade) e a variação espacial de incidência determinada pelo clima. Em meta análise de abrangência global, feita com objetivo de caracterizar a incidência de pneumonia associada à ventilação mecânica causada por *A. baumannii* encontrou-se maior número de infecções em países próximos ao Equador⁴⁴, ou seja, em países com clima quente e úmido e, em sua maioria, subdesenvolvidos. Nestes países não há, em sua maior parte, climatização artificial, o que torna a ação das variáveis climáticas externas mais presentes e com maior impacto nas infecções hospitalares.

É nesse contexto espacial e climático que se insere nosso estudo. A cidade de Botucatu tem clima denominado "tropical de altitude", com média global de temperatura por volta dos 22°C. O HCFMB possui climatização artificial somente nas UTI, sendo as enfermarias compostas de corredores largos, amplas janelas e sacadas abertas para o exterior. Nesse hospital, já havíamos caracterizado anteriormente o tanto a sazonalidade quanto o impacto da temperatura sobre incidência de ICS-BGN.^{49,50}

A sazonalidade não deve ser interpretada como "mera curiosidade epidemiológica", e sim ser analisado de forma a identificar o momento oportuno e a natureza ideal de ações de prevenção e controle. É especialmente relevante considerar que hospitais e outros serviços de saúde podem apresentar condições sazonais de funcionamento (ex.: rotina cirúrgica, ingresso de novos médicos residentes, fechamento parcial em fim de ano, etc.)

Esse foi o princípio do nosso estudo. Partindo da evidência acumulada nos últimos anos, essa pesquisa buscou identificar variações de fatores de risco e agentes etiológicos em diferentes estações. Os fatores de risco apresentaram um padrão relativamente monótono, com ocorrência estável ao longo do ano. Pequenas diferenças, como o uso de Cefalosporinas de 1ª/2ª. gerações ao longo do inverno, podem refletir a atividade cirúrgica mais intensa nesse período. O fato de a neutropenia ser mais frequente em meses quentes ainda desafia nossa explicação. Um aspecto curioso e inesperado foi o menor uso de linezolida nas três estações

em comparação ao inverno. O uso de oxazolidinona é estrito para germes Gram-positivos. Usualmente empregado em nosso serviço somente após cultura positiva, sendo os únicos patógenos com perfil de resistência que nos leva a esta escolha os enterococos resistentes à vancomicina, tal achado nos faz pensar se há associação entre o inverno e *Enterococcus* spp. São necessários novos estudos para investigar essa possível sazonalidade.

Por outro lado, os "picos de verão" de *A. baumannii* e *Klebsiella* spp. foram consistentes. Isso está de acordo com achados prévios da literatura.^{42,49} Esses microrganismos estavam também associados a maior temperatura ambiental, um fenômeno também já relatado.⁵⁰ De forma interessante, essas associações persistiram mesmo após ajuste para fatores de risco específicos para estes microrganismos, tais como internação na UTI e uso de carbapenems. A esse respeito, vale notar que, mesmo quando restringimos nossa análise a pacientes internados em UTI (unidades climatizadas), a associação com a temperatura externa com *Klebsiella* spp (OR, 1,31; IC95%, 1,09-1,57; p=0,004) e *A. baumannii* (OR, 1,36; IC95%, 1,13-1,63; p=0,001) persiste. Um achado semelhante é obtido quando incluímos somente pacientes com ICS primária associada a cateter central (que correspondem a 68,8% do total de sujeitos da pesquisa).

Esse fenômeno teve também impacto sobre resistência a antimicrobianos. Como se vê na **Figura 7**, a resistência de *A. baumannii* à maior parte dos antibióticos – e ao imipenem em particular – foi discrepante

em relação aos outros agentes. Portanto, o predomínio dessa bactéria em períodos quentes e no verão foi associado a elevação na resistência a imipenem, com implicações para tratamento e, potencialmente, para o prognóstico dos pacientes. É interessante observar que, se conduzimos uma regressão logística binária multivariada com a resistência a imipenem como desfecho, encontramos associação importante com a temperatura (**Tabela 8**).

Tabela 8. Modelo final de regressão logística binária multivariada tendo como desfecho a resistência a imipenem em bacilos Gram-negativos.

Fator	OR (IC95%)	p
Temperatura	1,13 (1,04-1,22)	0,002
Tempo sob risco	0,96 (0,94-0,98)	<0,001
Úlcera de pressão	2,27 (1,28-4,01)	0,005
Uso de Cefalosporinas de 3 ^a ./4 ^a .	2,45 (1,40-4,28)	0,002
Uso de Carbapenems	7,49 (4,03-13,84)	<0,001
Uso de anaerobicidas	2,33 (1,28-4,22)	0,005

Nota. A seleção de variáveis se fez por estratégia de avanços, com p-valores de 0,05 e 0,1 para entrada e permanência nos modelos.

Dois aspectos do nosso estudo devem ser enfatizados. Primeiro, foi realizado em um hospital localizado em uma área tropical. Isso é interessante, uma vez que a maioria dos estudos sobre a sazonalidade das

IRAS e dos BGN foram conduzidos em países de clima temperado.³³ Nos trópicos, as variações climáticas (temperatura e umidade) entre diferentes estações são tênues, quando comparadas às observadas em áreas temperadas. O verão é quente e chuvoso, enquanto uma baixa moderada de temperatura e umidade ocorre durante o inverno. Portanto, a associação de estações mais quentes e temperaturas mais altas com BGN específicos parece ser válida para a maioria das latitudes.

Um segundo aspecto diz respeito aos padrões globais de demografia, comorbidades e procedimentos entre os sujeitos do estudo. Eles eram bastante antigos (idade mediana, 62), com várias comorbidades (mediana da pontuação de Charlson, 3). Quase metade deles (48,6%) foi internada em UTI, 39,5% adquiriram IRAS em dois ou mais sítios, e a maioria tinha dispositivos invasivos inseridos. Finalmente, 49,8% deles morreram durante a internação. Essas são características comuns de ICS-BGN.⁹⁰ O fato de que os fatores de risco estavam presentes em taxas semelhantes durante diferentes estações sugere que as propriedades intrínsecas dos microorganismos (invasividade ou capacidade de sobrevivência em reservatórios ambientais), em vez de mudanças nos processos de cuidados de saúde, estão associadas à sazonalidade.

Há algumas limitações no nosso estudo. Primeiro, ele é de um único centro, e os casos foram selecionados ao longo de um período relativamente curto (quatro anos). Nós também não estudamos o possível impacto das férias de verão sobre a escassez de recursos humanos

(*understaffing*) e incidência de ICS-BGN.^{33,43} O delineamento de nossa pesquisa também não permitiu levar em consideração a possibilidade de competição entre diferentes microrganismos (incluídos ou não no estudo) no hospital. Esse fenômeno foi recentemente descrito por nosso grupo.⁹¹ Outra característica passível de ser questionada é se, de fato, a temperatura ambiental externa usada como parâmetro nesta pesquisa corresponde à intra-hospitalar, detectada no interior das unidades de internação. Um novo estudo do mesmo grupo está em andamento no presente momento, com a avaliação da temperatura nas diferentes alas hospitalares.

No entanto, também há pontos fortes. Este é, até onde sabemos, o primeiro estudo que analisa conjuntamente os fatores de risco tradicionais, as estações do ano e os parâmetros meteorológicos, para identificar seu impacto sobre a epidemiologia de IRAS. Nós realizamos extensa revisão de prontuários e fomos rigorosos na aplicação dos testes estatísticos.

Em resumo, nosso estudo identificou o impacto de estações do ano e meteorologia na etiologia de ICS-BGN. Esse impacto foi independente de aspectos demográficos, comorbidades, procedimentos invasivos e uso de antimicrobianos. Ele foi detectado tanto em unidades climatizadas quanto naquelas que não dispunham desse recurso. Se, por um lado, várias dúvidas persistem sobre os mecanismos da sazonalidade de ICS-BGN, nossos achados reforçam a necessidade de intensificar medidas de controle de infecção no verão e/ou em períodos quentes.

Conclusão

CONCLUSÃO

- Observou-se associação entre o verão e infecções de corrente sanguínea causadas por *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella* spp. Esta última também apresentou incidência elevada na primavera.
- De forma análoga, o isolamento em hemoculturas de *A. baumannii* e *Klebsiella* spp. foi associado a temperaturas diárias elevadas na data do diagnóstico. Houve também associação entre umidade relativa do ar e *Klebsiella* spp.
- Uma vez que *A. baumannii* apresentou grande taxa de resistência ao imipenem, os períodos de alta temperatura foram associados a maior incidência de isolados resistentes.
- Os padrões descritos acima se mantem mesmo em modelos ajustados para fatores de risco tradicionais, como comorbidades, tempo de exposição ao serviço de saúde, procedimentos e dispositivos invasivos, e uso de antimicrobianos.
- Podemos conjecturar, com base nos resultados, que características intrínsecas dos microrganismos (capacidade de sobreviver em reservatórios ambientais, invasividade) são fatores causais para sazonalidade.
- Os achados também reforçam a orientação de intensificação de medidas de prevenção e controle de IRAS em períodos quentes.

Referências bibliográficas

REFERÊNCIAS

1. Eliade M. História das crenças e das ideias religiosas. Volume 1: Da Idade da pedra aos mistérios de Elêusis. São Paulo: Zahar, 2010.
2. Hippocrate. On airs, Waters and places (translated from the Greek by Francis Adams). Internet Classics Archives (<http://classics.mit.edu/Hippocrates/airwatpl.mb.txt>).
3. Houaiss A. Dicionário Houaiss da língua portuguesa. São Paulo: Objetiva, 2001.
4. Altizer S, Dobson A, Hosseini P, Hudson P, Pascual M, Rohani P. Seasonality and the dynamics of infectious diseases. *Ecol Lett.* 2006;9:467-84.
5. Naumova E. Mystery of seasonality: getting the rhythm of nature. *J Public Health Policy.* 2006;27:2-12.
6. Fisman DN. Seasonality of infectious diseases. *Annu Rev Public Health.* 2007;28:127-43.
7. Hirve S, Newman LP, Paget J, Azziz-Baumgartner E, Fitzner J, Bhat N, Vandemaele K, Zhang W. Influenza Seasonality in the Tropics and Subtropics - When to Vaccinate? *PLoS One.* 2016;11:e0153003.
8. Fisman D. Seasonality of viral infections: mechanisms and unknowns. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18:946-54.

9. Dowell S, Ho M. Seasonality of infectious diseases and severe acute respiratory syndrome – what we don't know can hurt us. *Lancet Infect Dis.* 2004; 4:704-708.
10. Omoro R, Tate JE, O'Reilly CE, Ayers T, Williamson J, Moke F, Schilling KA, Awuor AO, Jaron P, Ochieng JB, Oundo J, Parashar UD, Parsons MB, Bopp CC, Nasrin D, Farag TH, Kotloff KL, Nataro JP, Panchalingam S, Levine MM, Laserson KF, Nuorti JP, Mintz ED, Breiman RF. Epidemiology, Seasonality and Factors Associated with Rotavirus Infection among Children with Moderate-to-Severe Diarrhea in Rural Western Kenya, 2008-2012: The Global Enteric Multicenter Study (GEMS). *PLoS One.* 2016;11:e0160060
11. Ouedraogo N, Ngangas SM, Bonkoungou IJ, Tiendrebeogo AB, Traore KA, Sanou I, Traore AS, Barro N. Temporal distribution of gastroenteritis viruses in Ouagadougou, Burkina Faso: seasonality of rotavirus. *BMC Public Health.* 2017;17:274.
12. Midgley CM, Haynes AK, Baumgardner JL, Chommanard C, Demas SW, Prill MM, Abedi GR, Curns AT, Watson JT, Gerber SI. Determining the Seasonality of Respiratory Syncytial Virus in the United States: The Impact of Increased Molecular Testing. *J Infect Dis.* 2017;216:345-55.
13. Kim JE, Lee H, Lee CH, Lee S. Assessment of optimal strategies in a two-patch dengue transmission model with seasonality. *PLoS One.* 2017;12:e0173673.

14. Shah M, Kathiiko C, Wada A, Odoyo E, Bundi M, Miringu G, Guyo S, Karama M, Ichinose Y. Prevalence, seasonal variation, and antibiotic resistance pattern of enteric bacterial pathogens among hospitalized diarrheic children in suburban regions of central Kenya. *Trop Med Health*. 2016;44:39.
15. Tjaden NB, Caminade C, Beierkuhnlein C, Thomas SM. Mosquito-Borne Diseases: Advances in Modelling Climate-Change Impacts. *Trends Parasitol*. 2017; pii: S1471-4922(17)30280-5.
16. Dowell S. Seasonal Variation in Host Susceptibility and Cycles of Certain Infectious Diseases. *Emerging Infectious Diseases*. 2001; 7: 369-374.
17. Allegranzi B, Pittet D. Preventing infections acquired during health-care delivery. *Lancet*. 2008;372:1719-20.
18. Allegranzi B, Bagheri Nejad S, Combescure C, Graafmans W, Attar H, Donaldson L, Pittet D. Burden of endemic health-care-associated infection in developing countries: systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2011;377:228-41
19. Bardossy AC, Zervos J, Zervos M. Preventing Hospital-acquired Infections in Low-income and Middle-income Countries: Impact, Gaps, and Opportunities. *Infect Dis Clin North Am*. 2016;30:805-18.
20. Pittet D, Allegranzi B, Storr J, Bagheri Nejad S, Dziekan G, Leotsakos A, Donaldson L. Infection control as a major World Health Organization priority for developing countries. *J Hosp Infect*. 2008;68:285-92.

21. Alp E, Damani N. Healthcare-associated infections in intensive care units: epidemiology and infection control in low-to-middle income countries. *J Infect Dev Ctries*. 2015;9:1040-5.
22. Guillaumet CV, Kollef MH. Update on ventilator-associated pneumonia. *Curr Opin Crit Care*. 2015;21:430-8.
23. Bassetti M, Righi E, Carnelutti A. Bloodstream infections in the Intensive Care Unit. *Virulence*. 2016;7:267-79.
24. Centro de Vigilância Epidemiológica. Apresentação dos Dados do IH – Ano 2016 – 23/06/17 (Internet). [Webconferencia.saude.sp.gov.br](http://webconferencia.saude.sp.gov.br) 2017 (cited 19 November 2017). Available from: <http://webconferencia.saude.sp.gov.br/pl6jb94uaja/?launcher=false&fcsContent=true&pbMode=normal>.
25. European Centre for Diseases Prevention and Control. Annual Epidemiological Report 2016 – Healthcare – associated infections acquired in Intensive Care units. (Internet). Stockholm: ECDC; 2016 . Available from: <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/healthcare-associated-infections-acquired-intensive-care-units-annual>
26. McGuire AR, DeJoseph ME, Gill JR. An approach to iatrogenic deaths. *Forensic Sci Med Pathol*. 2016;12:68-80.
27. Boev C, Kiss E. Hospital-Acquired Infections: Current Trends and Prevention. *Crit Care Nurs Clin North Am*. 2017;29:51-65.

28. Haller S, Deindl P, Cassini A, Suetens C, Zingg W, Abu Sin M, Velasco E, Weiss B, Ducomble T, Sixtensson M, Eckmanns T, Harder T. Neurological sequelae of healthcare-associated sepsis in very-low-birthweight infants: Umbrella review and evidence-based outcome tree. *Euro Surveill.* 2016;21:30143.
29. Nelson RE, Nelson SD, Khader K, Perencevich EL, Schweizer ML, Rubin MA, Graves N, Harbarth S, Stevens VW, Samore MH. The Magnitude of Time-Dependent Bias in the Estimation of Excess Length of Stay Attributable to Healthcare-Associated Infections. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2015;36:1089-94.
30. Badia JM, Casey AL, Petrosillo N, Hudson PM, Mitchell SA, Crosby C. Impact of surgical site infection on healthcare costs and patient outcomes: a systematic review in six European countries. *J Hosp Infect.* 2017;96:1-15.
31. Vincent JL. Nosocomial infections in adult intensive-care units. *Lancet.* 2003 Jun 14;361:2068-77.
32. Coffin SE, Zaoutis TE. Infection control, hospital epidemiology, and patient safety. *Infect Dis Clin North Am.* 2005;19:647-65.
33. Richet H. Seasonality in Gram-negative and healthcare-associated infections. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18:934-40.
34. Spackova M, Altmann D, Eckmanns T, Koch J, Krause G. High level of gastrointestinal nosocomial infections in the German surveillance system, 2002–2008. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2010; 31: 1273–8.

35. Danial J, Cepeda JA, Cameron F, Cloy K, Wishart D, Templeton KE. Epidemiology and costs associated with norovirus outbreaks in NHS. Lothian, Scotland 2007–2009. *J Hosp Infect* 2011; 79: 354–8.
36. Kim MJ, Song JH, Park YJ, Kim GA, Lee SW. The influence of seasonal factors on the incidence of peritonitis in continuous ambulatory peritoneal dialysis in the temperate zone. *Adv Perit Dial* 2000; 16: 243–7.
37. Durkin MJ, Dicks KV, Baker AW, Lewis SS, Moehring RW, Chen LF, Sexton DJ, Anderson DJ. Seasonal Variation of Common Surgical Site Infections: Does Season Matter? *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2015;36:1011-6.
38. Haws BE, Braun BM, Creech TB, Barnard ER, Miller AN. Is There a Seasonal Influence on Orthopaedic Surgical Wound Infection Rates? *J Surg Orthop Adv.* 2016 ;25:172-5.
39. Anthony CA, Peterson RA, Polgreen LA, Sewell DK, Polgreen PM. The Seasonal Variability in Surgical Site Infections and the Association With Warmer Weather: A Population-Based Investigation. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2017;38:809-816.
40. McDonald LC, Banerjee SN, Jarvis WR. Seasonal variation of Acinetobacter infections: 1987-1996. *Nosocomial Infections Surveillance System. Clin Infect Dis.* 1999;29:1133-7.
41. Perencevich EN, McGregor JC, Shardell M, Furuno JP, Harris AD, Morris JG Jr, Fisman DN, Johnson JA. Summer Peaks in the Incidences of

- Gram-Negative Bacterial Infection Among Hospitalized Patients. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2008;29:1124-31.
42. Anderson DJ, Richet H, Chen LF, Spelman DW, Hung YJ, Huang AT, Sexton DJ, Raoult D. Seasonal variation in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection on 4 continents. *J Infect Dis*. 2008;197:752-6.
43. Eber MR, Shardell M, Schweizer ML, Laxminarayan R, Perencevich EN. Seasonal and temperature-associated increases in gram-negative bacterial bloodstream infections among hospitalized patients. *PLoS One* 2011;6:e25298.
44. Hurley JC. World-wide variation in incidence of *Acinetobacter* associated ventilator associated pneumonia: a meta-regression. *BMC Infect Dis*. 2016;16:577.
45. Schwab F, Gastmeier P, Meyer E. The warmer the weather, the more gram-negative bacteria - impact of temperature on clinical isolates in intensive care units. *PLoS One* 2014;9:e91105.
46. Kolonitsiou F, Papadimitriou-Olivgeris M, Spiliopoulou A, Stamouli V, Papakostas V, Apostolopoulou E, Panagiotopoulos C, Marangos M, Anastassiou ED, Christofidou M, Spiliopoulou I. Trends of Bloodstream Infections in a University Greek Hospital during a Three-Year Period: Incidence of Multidrug-Resistant Bacteria and Seasonality in Gram-negative Predominance. *Pol J Microbiol* 2017;66:171-180.
47. Fisman D, Patrozou E, Carmeli Y, Perencevich E, Tuite AR, Mermel LA5; Geographical Variability of Bacteremia Study Group. Geographical

- variability in the likelihood of bloodstream infections due to gram-negative bacteria: correlation with proximity to the equator and health care expenditure. PLoS One 2014;9:e114548.
48. Ramos GP, Rocha JL, Tuon FF. Seasonal humidity may influence *Pseudomonas aeruginosa* hospital-acquired infection rates. Int J Infect Dis. 2013;17:e757-61.
49. Fortaleza CM, Caldeira SM, Moreira RG, Akazawa RT, Corrente JE, de Souza Ldo R, da Cunha AR. Tropical healthcare epidemiology: weather determinants of the etiology of bloodstream infections in a Brazilian hospital. Infect Control Hosp Epidemiol. 2014;35:85-8.
50. Caldeira SM, Cunha AR, Akazawa RT, Moreira RG, Souza Ldo R, Fortaleza CM. Weather parameters and nosocomial bloodstream infection: a case-referent study. Rev Saude Publica. 2015;49:19.
51. Trent MS. Biosynthesis, transport, and modification of lipid A. Biochem Cell Biol; 2064; 82:71–86.
52. Raetz CR, Reynolds CM, Trent MS, Bishop RE. Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. Annu Rev Biochem 2007;76: 295–329.
53. Fukuta Y, Clarke LG, Shields RK, Wagener MM, Pasculle AW, Doi Y. Lack of seasonality in the occurrence of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* complex. Infect Control Hosp Epidemiol. 2012;33:1051-2.

54. Christie C, Mazon D, Hierholzer W Jr, Patterson JE. Molecular heterogeneity of *Acinetobacter baumannii* isolates during seasonal increase in prevalence. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1995;16:590-4.
55. McCarthy N, Giesecke J. Case-case comparisons to study causation of common infectious diseases. *Int J Epidemiol*. 1999;28:764-8.
56. Porta M. A dictionary of epidemiology. 6th Ed. Oxford: Oxford University Press, 2014.
57. Porta M. A dictionary of epidemiology. 5th Ed. Oxford: Oxford University Press, 2008.
58. Farrington CP. Control without separate controls: evaluation of vaccine safety using case-only methods. *Vaccine*. 2004;22:2064-70.
59. Nordmann S, Biard L, Ravaud P, Esposito-Farèse M, Tubach F. Case-only designs in pharmacoepidemiology: a systematic review. *PLoS One*. 2012;7:e49444.
60. Hallas J, Pottegård A. Use of self-controlled designs in pharmacoepidemiology. *J Intern Med*. 2014; 275:581-9.
61. Rosenbaum PR. The case-only odds ratio as a causal parameter. *Biometrics*. 2004;60:233-40.
62. Gillespie IA, O'Brien SJ, Frost JA, Adak GK, Horby P, Swan AV, Painter MJ, Neal KR; *Campylobacter* Sentinel Surveillance Scheme Collaborators. A case-case comparison of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* infection: a tool for generating hypotheses. *Emerg Infect Dis*. 2002;8:937-42.

63. Lévesque S, Fournier E, Carrier N, Frost E, Arbeit RD, Michaud S. Campylobacteriosis in urban versus rural areas: a case-case study integrated with molecular typing to validate risk factors and to attribute sources of infection. *PLoS One*. 2013;8:e83731.
64. Varga C, Middleton D, Walton R, Savage R, Tighe MK, Allen V, Ahmed R, Rosella L. Evaluating risk factors for endemic human *Salmonella enteritidis* infections with different phage types in Ontario, Canada using multinomial logistic regression and a case-case study approach. *BMC Public Health*. 2012;12:866
65. Zenner D, Janmohamed K, Lane C, Little C, Charlett A, Adak GK, Morgan D. The serotype case-case design: a direct comparison of a novel methodology with a case-control study in a national *Salmonella enteritidis* PT14b outbreak in England and Wales. *Epidemiol Infect*. 2013;141:2346-53.
66. Arnedo-Pena A, Vivas-Fornas I, Meseguer-Ferrer N, Tirado-Balaguer MD, Yagüe-Muñoz A, Herrera-León S, Sabater-Vidal S, Romeu-García MÁ, Vizcaino Batllés A, Bellido-Blasco JB, Moreno-Muñoz R. Comparison of sporadic cases of *Salmonella typhimurium* with other *Salmonella* serotypes in Castellon (Spain): case-case study. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2017 Oct 7. pii: S0213-005X(17)30228-8. doi: 10.1016/j.eimc.2017.08.008. [Epub ahead of print]
67. Camargo MC, Koriyama C, Matsuo K, Kim WH, Herrera-Goepfert R, Liao LM; Eurgast-EPIC Group, Yu J, Carrasquilla G, Sung JJ, Alvarado-

- Cabrero I, Lissowska J, Meneses-Gonzalez F, Yatabe Y, Ding T, Hu N, Taylor PR, Morgan DR, Gulley ML, Torres J, Akiba S, Rabkin CS. Case-case comparison of smoking and alcohol risk associations with Epstein-Barr virus-positive gastric cancer. *Int J Cancer*. 2014;134:948-53.
68. Jennings MC, Tilley DH, Ballard SB, Villanueva M, Costa FM, Lopez M, Steinberg HE, Luna CG, Meza R, Silva ME, Gilman RH, Simons MP, Maves RC, Cabada MM. Case-Case Analysis Using 7 Years of Travelers' Diarrhea Surveillance Data: Preventive and Travel Medicine Applications in Cusco, Peru. *Am J Trop Med Hyg*. 2017;96:1097-1106.
69. Bellido-Blasco JB, Sabater-Vidal S, Salvador-Ribera Mdel M, Arnedo-Pena A, Tirado-Balaguer MD, Meseguer-Ferrer N, Silvestre-Silvestre E, Romeu-García MÀ, Herrero-Carot C, Moreno-Muñoz MR. Rotavirus vaccination effectiveness: a case-case study in the EDICS project, Castellón (Spain). *Vaccine*. 2012;30:7536-40.
70. Guglielmetti L, Veziris N, Aubry A, Brossier F, Bernard C, Sougakoff W, Jarlier V, Robert J. Risk factors for extensive drug resistance in multidrug-resistant tuberculosis cases: a case-case study. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2018;22:54-59.
71. Bonjour MA, Montagne M, Zambrano M, Molina G, Lippuner C, Wadskier FG, Castrillo M, Incani RN, Tami A. Determinants of late disease-stage presentation at diagnosis of HIV infection in Venezuela: a case-case comparison. *AIDS Res Ther*. 2008;5:6.

72. Morgan OW, Rodrigues B, Elston T, Verlander NQ, Brown DF, Brazier J, Reacher M. Clinical severity of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027: a case-case study. PLoS One. 2008;3:e1812.
73. Patterson L, Wilcox MH, Fawley WN, Verlander NQ, Geoghegan L, Patel BC, Wyatt T, Smyth B. Morbidity and mortality associated with *Clostridium difficile* ribotype 078: a case-case study. J Hosp Infect. 2012;82:125-8.
74. Robert J, Bismuth R, Lemaitre N, Jarlier V. Gentamicin-susceptible or gentamicin-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a case-case study. Infect Control Hosp Epidemiol. 2006;27:879-83.
75. Freeman JT, Rubin J, McAuliffe GN, Peirano G, Roberts SA, Drinković D, Pitout JD. Differences in risk-factor profiles between patients with ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: a multicentre case-case comparison study. Antimicrob Resist Infect Control. 2014;3:27.
76. Rothman KJ, Greenland S, Lash TL. Modern epidemiology. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2008.
77. Szklo M, Javier Nieto F. Epidemiology – beyond the basics. Burlington: Jones & Bartlett, 2014.
78. Safdar N, Maki DG. The commonality of risk factors for nosocomial colonization and infection with antimicrobial-resistant *Staphylococcus aureus*, enterococcus, gram-negative bacilli, *Clostridium difficile*, and *Candida*. Ann Intern Med 2002;136:834-44.

79. Falagas ME, Kopterides P. Risk factors for the isolation of multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: a systematic review of the literature. *J Hosp Infect* 2006;64:7-15.
80. van Loon K, Voor In 't Holt AF, Vos MC. A Systematic Review and Meta-analyses of the Clinical Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 2017;62: e01730-17.
81. Angeletti S. Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. *J Microbiol Methods* 2017;138:20–9.
82. Cohen AL, Calfee D, Fridkin SK, Huang SS, Jernigan JA, Lautenbach E, Oriola S, Ramsey KM, Salgado CD, Weinstein RA; Society for Healthcare Epidemiology of America and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. Recommendations for metrics for multidrug-resistant organisms in healthcare settings: SHEA/HICPAC Position paper . *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2008;29:901-13.
83. Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chronic Dis*. 1987;40:373-83.
84. Biesheuvel CJ, Vergouwe Y, Steyerberg EW, Grobbee DE, Moons KG. Polytomous logistic regression analysis could be applied more often in diagnostic research. *J Clin Epidemiol* 2008;61:125-34.

85. Rocha BAM, Guilarde AO, Argolo AFLT, Tassara MP, da Silveira LA, Junqueira IC, Turchi MD, Féres VCR, Martelli CMT. Dengue-specific serotype related to clinical severity during the 2012/2013 epidemic in centre of Brazil. *Infect Dis Poverty*. 2017;6:116.
86. Morales-Campos DY, Vanderpool RC. Examining differences in HPV awareness and knowledge and HPV vaccine awareness and acceptability between U.S. Hispanic and island Puerto Rican women. *J Health Dispar Res Pract*. 2017;10:1-18.
87. Greenland S. Modeling and variable selection in epidemiologic analysis. *Am J Public Health* 1989;79:340-9.
88. Harris AD, Karchmer TB, Carmeli Y, Samore MH. Methodological principles of case-control studies that analyzed risk factors for antibiotic resistance: a systematic review. *Clin Infect Dis* 2001;32:1055-61.
89. Box GR, Jenkins GM, Reinsel GC. Time series analysis. Forecasting and control. Hoboken: Wiley, 2008.
90. Ergönül Ö, Aydın M, Azap A, Başaran S, Tekin S, Kaya Ş, Gülsün S, Yörük G, Kurşun E, Yeşilkaya A, Şimşek F, Yılmaz E, Bilgin H, Hatipoğlu Ç, Cabadak H, Tezer Y, Togan T, Karaoğlan I, İnan A, Engin A, Alışkan HE, Yavuz SŞ, Erdinç Ş, Mulazimoglu L, Azap Ö, Can F, Akalın H, Timurkaynak F; Turkish Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Healthcare-Related Infections Study Group. Healthcare-associated Gram-negative bloodstream infections: antibiotic resistance and predictors of mortality. *J Hosp Infect* 2016; 94:381-385.

91. Lastoria LC, Caldeira SM, Moreira RG, Akazawa RT, Maion JC, Fortaleza CM. Ecological competition and the incidence of *Acinetobacter baumannii* bloodstream infections in a teaching hospital in Southeastern Brazil. Rev Soc Bras Med Trop 2014;47:583-8.