



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA – *CAMPUS* DE SOBRAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**CARLOS VICTOR FONTENELE PINHEIRO**

**ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÔMICA ASSOCIADA À RESISTÊNCIA  
ANTIMICROBIANA DE BACILOS GRAM-NEGATIVOS NÃO  
FERMENTADORES ISOLADOS DE PACIENTES INTERNADOS NO  
HOSPITAL REGIONAL NORTE EM SOBRAL - CE**

**SOBRAL**

**2023**

**CARLOS VICTOR FONTENELE PINHEIRO**

**ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÔMICA ASSOCIADA À RESISTÊNCIA  
ANTIMICROBIANA DE BACILOS GRAM-NEGATIVOS NÃO  
FERMENTADORES ISOLADOS DE PACIENTES INTERNADOS NO  
HOSPITAL REGIONAL NORTE EM SOBRAL - CE**

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará (UFC) como requisito final para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde. Área de concentração: Biologia molecular e de microrganismo  
Orientador: Prof. Dr. Francisco César Barroso Barbosa

**SOBRAL**

**2023**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- P718e Pinheiro, Carlos Victor Fontenele.  
ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÔMICA ASSOCIADA À RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE BACILOS GRAM-NEGATIVOS NÃO FERMENTADORES ISOLADOS DE PACIENTES INTERNADOS NO HOSPITAL REGIONAL NORTE EM SOBRAL - CE / Carlos Victor Fontenele Pinheiro. – 2023.  
70 f.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Sobral, 2023.  
Orientação: Prof. Me. Francisco César Barroso Barbosa.
1. Infecção nosocomial. 2. Bactérias MDR. 3. Carbapenemases. 4. Resistência antimicrobiana. I. Título.  
CDD 610
-

**CARLOS VICTOR FONTENELE PINHEIRO**

**ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÔMICA ASSOCIADA À RESISTÊNCIA  
ANTIMICROBIANA DE BACILOS GRAM-NEGATIVOS NÃO  
FERMENTADORES ISOLADOS DE PACIENTES INTERNADOS NO  
HOSPITAL REGIONAL NORTE EM SOBRAL - CE**

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará (UFC) como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde. Área de concentração: Biologia molecular e de microrganismo

Aprovada em \_\_\_/\_\_\_/2023.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Francisco César Barroso Barbosa – Orientador  
Universidade Federal do Ceará – (UFC)

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Virgínia Régia Souza da Silveira – 1<sup>a</sup> Examinadora  
Universidade Federal do Ceará – (UFC)

---

Prof. Dr. Daniel Hardy Melo – 2<sup>o</sup> Examinador  
Universidade Federal do Ceará – (UFC)

À minha família, principalmente minha  
vozinha Giseuda que sempre me apoiou e  
cuidou de mim com muito amor e  
carinho. Saudades!

Dedico.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a DEUS, por ter me ajudado a passar por esse período de acontecimentos de forma que não desistisse de tudo e todos.

À minha mãe Rosa Fontenele, por ter sempre me guiado na busca do conhecimento, às minhas irmãs Caroline Fontenele, Claudia Lireda e Natalia Fontenele, por sempre estarem dispostas a apoiar minhas decisões e por sempre estarem disponível para ajudar. À minha esposa Aline Mendes, por toda paciência do mundo, carinho, respeito e compreensão por cada dia ausente de casa. Aos meus filhos Guilherme Fontenele e Ana Louize por terem paciência com o pai e por ajudarem nas tarefas quando eu me ausentava. Ao meu avô por ter me dado uma base para início da minha vida aqui em Sobral. À minha avó Giseuda Fontenele que sempre me deu carinho, amor e cuidou de mim como se fosse um filho, muito obrigado por ter me ajudado em tudo. E a todos meus familiares que sempre estiveram nessa etapa da minha vida.

Ao meu orientador um carinho especial, Prof. César, por todo o conhecimento transmitido, pelo apoio em decisões, por sua disponibilidade, compreensão e preocupação durante todo o desenvolvimento da pesquisa, não tenho palavras para descrever a admiração e o carinho que tenho. Muito obrigado!

À minha banca examinadora, Professores doutores Virgínia Régia Souza da Silveira e Daniel Hardy Melo, pelas considerações realizadas. Dessa forma contribuindo para o desenvolvimento da pesquisa.

Aos amigos que o mestrado me trouxe, Erika Cardona, Stephanie Almeida, Ludimila Gomes, Guilherme Mendes, Paulo de Tasso, Mateus Gomes, Mykelly Gomes, Maria Walcleanes “Wal”, Júlio Cesar e Marina Rodrigues. Cada um desses de algum modo contribuiu com essa pesquisa.

Aos meus amigos Emmanoel David, Henrique Morais, Diana Karla, Juliana Teruel, Josy Bezerra, Patrícia Rosa, Giovanna Randal, Camila Albuquerque. Agradeço a amizade de todos. Queria também agradecer a Luiz Fernando, que me acompanhou desde a minha infância e está nos momentos mais importantes da minha vida, obrigado amigo. E a todos aqueles que contribuíram para minha vida profissional e pessoal.

Busquem, pois, em primeiro lugar o reino de Deus e sua justiça, e todas as demais coisas serão acrescentadas

*Bíblia Sagrada: Mateus 6,33.*

## RESUMO

As infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) são aquelas que aparecem durante a hospitalização do paciente e não estavam presentes ou em incubação no momento da admissão, elas são geralmente produzidas por microrganismos com resistência múltipla a antibióticos, desses destacam-se os bacilos gram-negativos não fermentadores (BGN-NF), tais como *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Stenotrophomonas maltophilia*. Portanto, o objetivo desta pesquisa foi realizar estudo genômico para identificação dos genes *bla*-KPC2, *bla*-*oxa*143 e *mcr*-1 responsáveis por padrões de resistência antimicrobiana em BGN-NF isolados de IRAS no Hospital Regional Norte (HRN) em Sobral-CE. A coleta das amostras microbiológicas ocorreu de março de 2021 a março de 2022, a identificação e o perfil de sensibilidade dos BGN-NF foram realizados pelo sistema automatizado VITEK®2 no laboratório São Carlos em Fortaleza – CE, laboratório de referência do HRN. Os isolados foram coletados de amostras clínicas de sangue, de infecções do trato respiratório, ponta de cateter e urina. A confirmação da identidade bacteriana e a análise genômica foi realizada por técnicas de biologia molecular no laboratório de microbiologia da UFC em Sobral. Verificamos que no período do estudo foram identificados 119 BGN-NF de pacientes com IRAS no HRN, sendo *P. aeruginosa* (n=51; 42,9%), *A. baumannii* (n=48; 40,3%) e *S. maltophilia* (n=20; 16,8%). Tendo sido observado uma maior prevalência de IRAS por *A. baumannii* (58,4%) em pacientes do gênero masculino e de *S. maltophilia* (65%) em mulheres. Do total de BGN-NF, somente 59 (49,5%) foram caracterizados em relação aos genes de resistência. Desses, 20 (33,8%) eram *A. baumannii*, sendo que 12 (60%) albergavam os genes *bla*-KPC2 e *bla*-*oxa*143 e 3 (15%) o gene *mcr*-1; dos 20 isolados de *P. aeruginosa* analisados, em 9 (45%) foram identificados os genes *bla*-KPC2 e *bla*-*oxa*143 e em 3 (15%) o *mcr*-1, e de 19 espécimes de *S. maltophilia*, 9 (47,3%) apresentaram o gene *bla*-KPC2 e 10 (52,7%) o *bla*-*oxa*143. Observou-se ainda que todas as cepas de *P. aeruginosa* foram resistentes à gentamicina, cefepime, piperacilina+tazobactam, tigeciclina e trimetoprima/sulfametazol e apresentaram padrão de resistência variável para os demais antimicrobianos testados. Por outro lado, todos os isolados de *A. baumannii* também apresentaram resistência à piperacilina+tazobactam e tigeciclina, além de meropenem e imipenem. Enquanto que a maioria das cepas de *S. maltophilia* foram resistentes à levofloxacina e trimetoprima/sulfametazol. Em relação ao desfecho clínico dos pacientes, constatou-se que 58,9% dos pacientes infectados por esses microrganismos foram a óbito. Portanto, os resultados desse estudo apontam que *P. aeruginosa* e *A. baumannii* estão entre as principais causas de IRAS por BGN-NF no HRN, além disso a maioria deles é multidroga resistente e alberga os genes de resistência *bla*-KPC2 e *bla*-*oxa*143 reforçando a ideia de como é importante conhecer a epidemiologia local para que, a partir dela, seja possível trabalhar de forma integrada com a Serviço de Controle de Infecção Hospitalar para a elaboração de orientações adequadas e regimes terapêuticos direcionados, visando diminuir a frequência de IRAS e obter um melhor prognóstico para os pacientes.

**Palavras Chaves:** Bactérias MDR, Carbapenemases, Infecção nosocomial, Resistência antimicrobiana.



## ABSTRACT

Health care-associated infections (HAIs) are those that appear during the patient's hospitalization and were not present or incubating at the time of admission, they are usually produced by microorganisms with multiple resistance to antibiotics, among which non-fermentative gram-negative bacilli (NF-GNB), such as *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Stenotrophomonas maltophilia*. Therefore, the aim of this research was to carry out a genomic study to identify the *bla*<sub>-KPC2</sub>, *bla*<sub>-oxa143</sub> and *mcr-1* genes responsible for patterns of antimicrobial resistance in NF-GNB isolated from HAIs at the North Regional Hospital (NRH) in Sobral - CE. The collection of microbiological samples took place from March 2021 to March 2022, the identification and sensitivity profile of the NF-GNB were performed by the VITEK®2 automated system at the São Carlos laboratory in Fortaleza - CE, NRH's reference laboratory. The isolates were collected from clinical samples of blood, respiratory tract infections, catheter tip and urine. Confirmation of bacterial identity and genomic analysis was performed using molecular biology techniques at the UFC microbiology laboratory in Sobral. We found that during the study period, 119 NF-GNB of patients with HAI were identified at the NRH, with *P. aeruginosa* (n=51; 42.9%), *A. baumannii* (n=48; 40.3%) and *S. maltophilia* (n=20; 16.8%). A higher prevalence of HAI due to *A. baumannii* (58.4%) was observed in male patients and *S. maltophilia* (65%) in female patients. Of the total NF-GNB, only 59 (49.5%) were characterized in relation to resistance genes. Of these, 20 (33.8%) were *A. baumannii*, with 12 (60%) harboring the *bla*<sub>-KPC2</sub> and *bla*<sub>-oxa143</sub> genes and 3 (15%) the *mcr-1* gene; of the 20 isolates of *P. aeruginosa* analyzed, in 9 (45%) *bla*<sub>-KPC2</sub> and *bla*<sub>-oxa143</sub> were identified and in 3 (15%) *mcr-1*, and of 19 specimens of *S. maltophilia*, 9 (47.3%) had the *bla*<sub>-KPC2</sub> and 10 (52.7%) had the *bla*<sub>-oxa143</sub>. It was also observed that all strains of *P. aeruginosa* were resistant to gentamicin, cefepime, piperacillin+tazobactan, tigecycline and trimethoprim/sulfamethazole and showed a variable resistance pattern for the other antimicrobials tested. On the other hand, all *A. baumannii* isolates also showed resistance to piperacillin+tazobactan and tigecycline, in addition to meropenem and imipenem. Whereas most strains of *S. maltophilia* were resistant to levofloxacin and trimethoprim/sulfamethazole. Regarding the clinical outcome of the patients, it was found that 58.9% of the patients infected by these microorganisms died. Therefore, the results of this study indicate that *P. aeruginosa* and *A. baumannii* are among the main causes of HAI due to NF-GNB in the NRH, in addition most of them are multidrug resistant and harbor the *bla*<sub>-KPC2</sub> and *bla*<sub>-oxa143</sub> resistance genes reinforcing the idea of how important it is to know the local epidemiology so that, based on it, it is possible to work in an integrated manner with the Hospital Infection Control Service to develop adequate guidelines and targeted therapeutic regimens, aiming to reduce the frequency of HAIs and obtain a better prognosis for patients.

Keywords: MDR bacteria, Carbapenemases, Nosocomial infection, Antimicrobial resistance.

## LISTA DE FIGURAS E QUADROS

<b>Figura 1</b> – Representação da estrutura química de cada classe da subfamília dos Beta-Lactâmicos	25
<b>Quadro 1</b> – Características dos antibióticos beta-lactâmicos	26
<b>Quadro 2</b> – <i>Primers</i> utilizados para amplificação dos genes de resistência deste estudo	38

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Relação do espectro de ação dos principais representantes dos carbapenêmicos	28
<b>Tabela 2</b> - Classificação das três classes de carbapenemases	29
<b>Tabela 3</b> - Frequência de BGN-NF isolados de pacientes com IRAS no HRN	41
<b>Tabela 4</b> - Perfil epidemiológico dos pacientes com IRAS infectados com BGN-NF no HRN	42
<b>Tabela 5</b> - Diagnóstico de Admissão dos pacientes com IRAS infectados com BGN-NF no HRN	43
<b>Tabela 6</b> - Setor hospitalar do isolamento de BGN-NF em pacientes com IRAS no HRN	44
<b>Tabela 7</b> - Sítio do isolamento de BGN-NF em pacientes com IRAS no HRN	46
<b>Tabela 8</b> - Genes de resistência detectados em BGN-NF isolados de pacientes com IRAS no HRN	47
<b>Tabela 9</b> - Perfil de sensibilidade antimicrobiana de BGN-NF isolados de pacientes com IRAS no HRN seguindo recomendações do BrCAST	49
<b>Tabela 10</b> - Correlação da presença dos genes <i>mcr-1</i> e <i>bla</i> <sub>kpc-2</sub> em BGN-NF com resistência à colistina e a carbapenêmicos	50
<b>Tabela 11</b> - Desfecho clínico dos pacientes com IRAS por BGN-NF no HRN	52

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AIM</b>	Australian <i>Imipenemase</i>
<b>AVC</b>	Acidente Vascular Cerebral
<b>BHI</b>	<i>Brain Heart Infusion</i>
<b>BGN-NF</b>	Bacilo gram-negativo não fermentador
<b>CCIH</b>	Comissões de Controle de Infecção Hospitalar
<b>CDC</b>	<i>Center for Disease Control</i>
<b>CEP</b>	Comitê de ética e pesquisa
<b>CHDL</b>	Resistência Hidrolisante de Carbapenem
<b>CIM</b>	Concentração Inibitória Mínima
<b>CNS</b>	Conselho Nacional de Saúde
<b>DAOP</b>	Doença arterial obstrutiva periférica
<b>ESBL</b>	$\beta$ -lactamases de espectro estendido
<b>GES</b>	Guiana extended spectrum
<b>GIM</b>	<i>German imipenemase</i>
<b>HRN</b>	Hospital Regional Norte
<b>ICS</b>	Infecção da Corrente Sanguínea
<b>IMI</b>	<i>Imipenem hydrolyzing carbapenemase</i>
<b>IMP</b>	Imipenemase
<b>IRAS</b>	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
<b>ISC</b>	Infecções de Sítio Cirúrgico
<b>ITR</b>	Infecção do Trato Respiratório
<b>ITU</b>	Infecção do Trato Urinário
<b>KPC</b>	<i>Klebsiella pneumoniae Carbapenemase</i>
<b>MBLs</b>	Metallo- $\beta$ -Lactamases
<b>MDR</b>	Multidroga Resistente
<b>NDM</b>	New Deli Metalobetalactamases
<b>NMC</b>	Não Metallo carbapenemase
<b>OIA I</b>	Observação Intermediária I
<b>PAV</b>	Pneumonia Associada a Ventilação Mecânica
<b>PK-PD</b>	Farmacocinéticos-farmacodinâmicos
<b>SCIH</b>	Serviço de Controle de Infecção Hospitalar

<b>SENTRY</b>	<i>Antimicrobial Surveillance Program</i>
<b>SIM</b>	Seoul imipenemase
<b>SME</b>	<i>Serratia marcescens enzyme</i>
<b>SMX-TMP</b>	Sulfametoxazol/trimetoprima
<b>SPM</b>	São Paulo Metalobetalactamase
<b>TCLE</b>	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<b>UFC</b>	Universidade Federal do Ceará
<b>UTI</b>	Unidades de Terapia Intensiva
<b>VIM</b>	Verona imipenemas

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
<b>2.1 IRAS no contexto hospitalar</b> .....	17
<b>2.2 <i>Acinetobacter baumannii</i></b> .....	19
<b>2.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i></b> .....	21
<b>2.4 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i></b> .....	23
<b>2.5 Betalactâmicos</b> .....	24
<b>2.6 Carbapenemases</b> .....	27
<b>2.6.1 Carbapenemases de classe A</b> .....	30
<b>2.6.2 Carbapenemases de classe B</b> .....	30
<b>2.6.3 Carbapenemases de classe D</b> .....	31
<b>2.7 mcr-1 e mcr-2</b> .....	32
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	34
<b>3.1 Objetivo geral</b> .....	34
<b>3.2 Objetivos Específicos</b> .....	34
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	35
<b>4.1 Coleta e identificação dos Isolados Bacterianos</b> .....	35
<b>4.2 Critérios de Inclusão e Exclusão</b> .....	35
<b>4.3 Teste de Suscetibilidade Antimicrobiana (TSA)</b> .....	36
<b>4.4 Reativação dos isolados bacterianos</b> .....	36
<b>4.6 Detecção e identificação dos genes de resistência por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)</b> .....	38
<b>4.7 Análise Estatística</b> .....	39
<b>4.8 Aspectos éticos</b> .....	39
<b>APÊNDICE I</b> .....	64
<b>ANEXO 01</b> .....	69

## 1. INTRODUÇÃO

As infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) são aquelas que aparecem durante a hospitalização do paciente e não estavam presentes ou em incubação no momento da admissão. Tais infecções podem se manifestar durante o período de internação ou após sua alta (WHO, 2011).

As IRAS atualmente demonstram ser um dos principais problemas de saúde, e que tendem a colocar em risco tanto a segurança dos pacientes, quanto a dos profissionais que trabalham diretamente na assistência à saúde, podendo gerar danos aos envolvidos no processo. Pesquisas demonstram que a vigilância ativa no controle das infecções, através dos Serviços de Controle de Infecção Hospitalar (SCIH), podem gerar uma redução significativa das IRAS e da propagação dos microrganismos, constituindo um desafio para os serviços de saúde (PADOVEZE; FORTALEZA, 2014; GOMES; MOARES, 2018).

De acordo com dados do Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 20 (Avaliação dos indicadores nacionais da IRAS e Resistência microbiana do ano de 2018), *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter* ssp. e *Pseudomonas aeruginosa* estão entre os principais microrganismos causadores de infecções relacionadas à assistência à saúde em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) adulto. Corroborando o panorama mundial, em nosso país, a resistência aos carbapenêmicos é o principal desafio entre esses microrganismos, sendo que aproximadamente 79%, 44,3% e 41,4% das espécies de *Acinetobacter*, *Enterobacteriaceae* e *P. aeruginosa*, respectivamente, mostraram-se resistentes a esses antibacterianos, conforme dados do Boletim citado anteriormente (BRASIL, 2018).

*P. aeruginosa* é classificada como o quinto agente causador mais comum de IRAS em pacientes hospitalizados nos eixos adulto e pediátrico, um dado importante é que quase 35% das cepas encontradas são resistentes aos carbapenêmicos, uma classe de antimicrobianos amplamente utilizada para tratar infecções por *P. aeruginosa*. Na verdade, indivíduos infectados com *P. aeruginosa* multidroga resistente (MDR) têm uma taxa de mortalidade mais alta (44,6%) em comparação com aqueles infectados com clones não MDR (24,8%) (MATOS *et al.*, 2018a).

Outro gram-negativo nosocomial listado é *Stenotrophomonas maltophilia*, conforme descreve Assis (2015), esse microrganismo é um importante patógeno hospitalar

emergente, naturalmente resistente aos carbapenêmicos, que possui sulfametoxazol/trimetoprima (SMX-TMP) como opção terapêutica. Porém, relatos de resistência a essa droga começaram a aparecer, além disso há uma prevalência desses microrganismos identificados em pacientes que estão em uso de ventilação invasiva na unidade de terapia intensiva, isso se demonstra pela capacidade de colonização desse sítio respiratório, uso de traqueostomia, exposição prévia a fluoroquinolona e terapia prolongada com carbapenêmicos ou cefalosporina de quarta geração (CORZO-DELGADO *et al.*, 2006).

*A. baumannii* faz parte do rol das bactérias gram-negativas que causam pneumonia, infecções do trato urinário, infecções respiratórias e meningite. É comumente encontrado na microbiota da pele humana. Contudo, infecções causadas por esses microrganismos são difíceis de tratar por causa de sua alta resistência a muitos antibióticos. Embora carbapenêmicos continuem a ser os fármacos de escolha para o tratamento de infecções por este patógeno, a disseminação de espécies multirresistentes colocou em risco a utilidade destes fármacos, passando-se a utilizar Ampicilina/Sulbactam como opção terapêutica para o tratamento de cepas carbapenêmicos-resistentes (PELEG, SEIFERT, PATERSON, 2008).

*A. baumannii* tem como principal alvo pacientes hospitalizados, principalmente os que necessitam de maiores cuidados, como os que estão internados nas UTI, principalmente aqueles que estão bastantes debilitados, com quebra de integridade da pele e com comprometimento das vias aéreas. A pneumonia ainda é a infecção mais prevalente causada por esta bactéria, no entanto, infecções envolvendo a pele, partes moles, ossos e sistema nervoso central, surgiram como problemáticas para algumas instituições (VIANA, *et al.*, 2013).

Em IRAS, *P. aeruginosa*, *S. maltophilia* e *A. baumannii* se destacam como oportunistas e tem sua virulência aumentada pelo estado imunológico dos pacientes que são submetidos a procedimentos invasivos sendo que as taxas de colonização podem exceder os 60% (ELABBADI *et al.*, 2019).

No panorama de IRAS demonstrado por programas de vigilância de resistência antimicrobiana, como é o caso do *Antimicrobial Surveillance Program* (SENTRY), percebe-se que os bacilos gram-negativos não fermentadores (BGN-NF) se destacam como mais frequentes em infecções do trato respiratório tanto nos Estados Unidos quanto na Europa. No Brasil, segundo o Boletim Informativo de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº20 de dezembro de 2018 da Agência Nacional de Vigilância



Sanitária (ANVISA) e publicado em janeiro de 2020, os bacilos gram-negativos, *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. resistentes a carbapenêmicos, *S. maltophilia* resistente a fluoroquinolonas, *Escherichia coli* resistente aos carbapenêmicos e cefalosporinas da 3ª geração, e *Klebsiella pneumoniae* sensível aos carbapenêmicos e resistente às cefalosporinas de 3ª geração, estão entre os cinco principais microrganismos associados às infecções de corrente sanguínea em pacientes hospitalizados (BRASIL, 2020).

A importância das infecções por bacilos gram-negativos torna-se maior pela falta de opções para o tratamento. Essa carência é decorrente da lenta inovação científica no que concerne aos antibióticos e ao aumento da resistência aos tratamentos já existentes. A vigilância epidemiológica do aumento da resistência antimicrobiana é um papel das Comissões de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH).

O Hospital Regional Norte (HRN) é o maior hospital do interior da Região Nordeste, com mais de 54 mil m<sup>2</sup> quadrados de área construída, sendo responsável por atender uma população estimada em 1,6 milhão de pessoas, dos 55 municípios integrantes da macrorregião Norte do Estado. Terciário (atende casos de média e alta complexidade) e conta com atendimento 24h em urgência e emergência, sendo referência em pediatria, cirurgias torácicas, cirurgias vasculares e otorrinolaringologia (ISGH, 2021).

Os relatórios referentes a 2022 do serviço de controle de infecção hospitalar - SCIH do HRN demonstraram que entre os microrganismos gram-negativos não fermentadores associados às IRAS com padrão de multirresistência antimicrobiana, a maior prevalência foi de *P. aeruginosa* (34,5%), *A.baumannii* (31,6%) e *S. maltophilia* (23,1%), respectivamente.

Considerando que cada unidade hospitalar guarda uma microbiota bacteriana específica e que o estudo dos microrganismos em seus aspectos mais pormenorizados contribui com o reconhecimento situacional no que concerne à resistência bacteriana, a observação do número de infecções por BGN-NF desperta o interesse de realizar o estudo da resistência aos antimicrobianos e da diversidade genômica associada a esses fatores de resistência como um modo de fornecer subsídios para a escolha da terapêutica adequada aos pacientes contribuindo para o uso racional dos antimicrobianos e um melhor prognóstico.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 IRAS no contexto hospitalar

Anteriormente denominadas como infecções hospitalares, a partir da década de 1990, foi substituído por infecções relacionadas à assistência em saúde (IRAS), sendo uma definição mais ampla, que incorpora aquelas adquiridas e relacionadas à assistência em qualquer ambiente (BRASIL, 2017; MATOS *et al.*, 2018a).

As infecções hospitalares podem ser causadas por procedimentos durante a assistência à saúde, podendo desenvolver-se em feridas após cirurgia ou ocorrerem quando microrganismos se disseminam através da transmissão vertical, passadas de um indivíduo para outro. As IRAS representam um problema de saúde pública em todo o mundo (EHRENTAUT *et al.*, 2018).

Portanto, IRAS são infecções adquiridas durante o cuidado assistencial a pacientes submetidos a procedimento ou não de risco, que não estavam presentes ou em incubação na admissão do paciente. Sua origem acontece a partir de 72h da admissão, podendo ocorrer por meio da internação, cirurgias, procedimentos ambulatoriais e inclusive após as altas hospitalares (BRASIL, 2017; MATOS *et al.*, 2018b).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as IRAS estão entre as maiores causas de morte e aumento da morbidade entre os hospitalizados. Estima-se que no Brasil, a cada 1.000 pacientes, 16 a 37 irão adquirir alguma IRAS, onde a taxa média de infecção hospitalar é de 9%, com uma letalidade de 14,35% (OMS, 2016).

Apresentam um impacto considerável quanto à letalidade, duração da internação, além do aumento significativo dos custos de hospitalização. As condições de gravidade em que os pacientes se encontram como imunocomprometidos, somado ao surgimento da resistência a antimicrobianos facilitam esse aumento da letalidade (PITTET *et al.*, 2018).

Esse tipo de infecção tem sido uma grande preocupação, principalmente aquelas causadas por microrganismos multirresistentes, ou seja, aqueles que apresentam resistência a pelo menos duas classes de antimicrobianos, reduzindo as alternativas de tratamento e prolongando internações, além de ocasionar óbitos e onerar a assistência (BRASIL, 2017).

A falta de higienização das mãos, uso indiscriminado de antibióticos, quebra de protocolos assistenciais e contaminações ambientais estão entre as principais causas de

IRAS. Entre as medidas profiláticas, a higienização das mãos é a mais eficiente e consensual para o controle nos serviços de saúde. Além de atender às exigências legais dos órgãos regulamentadores em nível nacional e mundial, esta prática contribui também para melhoria da qualidade no atendimento e assistência ao paciente (WHO, 2011).

A resistência bacteriana é um problema atual, mundialmente preocupante. O crescimento da resistência entre as bactérias multirresistentes têm culminado no aparecimento cada vez mais frequente de espécies agressivas ao ser humano, exigindo esforço multidisciplinar para prevenção e controle, além de uma detecção laboratorial eficiente (ANGLES, 2018).

A história recente do controle de IRAS no Brasil sofreu impacto de eventos epidêmicos. Os surtos de micobactérias de crescimento rápido em procedimentos invasivos trouxeram à tona falhas importantes no reprocessamento de artigos, agravadas pela detecção de resistência de micobactérias de crescimento rápido ao glutaraldeído (NOGUEIRA *et al.*, 2014).

Surtos de *K. pneumoniae* produtoras da carbapenemase e *Enterococcus spp.* resistentes à vancomicina repercutiram na imprensa, culminando na proibição da compra de antimicrobianos sem receituário e na obrigatoriedade do uso de preparação alcoólica nas instituições. Quanto à área de suporte de laboratório e resistência microbiana, houve a formação de comitês assessores compostos por especialistas (NOGUEIRA *et al.*, 2014).

Nesse ínterim, percebe-se a necessidade de um trabalho multissetorial para o combate à resistência que incluam um plano nacional abrangente, capacidade laboratorial para realizar a vigilância de microrganismos resistentes, acesso a antimicrobianos seguros e controle do uso indevido, sensibilização e compreensão do público em geral e programas eficazes de prevenção e controle de infecções. A consolidação de um sistema ou programa nacional também é de extrema importância, uma vez que existem apenas ações locais em alguns estados. É preciso também estabelecer o monitoramento e a avaliação periódica dos programas existentes, propondo prazos e condições para superar as barreiras de implementação de algumas estratégias (BRASIL, 2017).

Diante desse cenário, no Brasil (2017) houve publicações para servirem como uma base técnico-científica. Dentre essas, os “Critérios Diagnósticos de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde”, que trata das Infecções de Sítio Cirúrgico (ISC), Infecção da Corrente Sanguínea (ICS), Infecção do Trato Respiratório (ITR) e Infecção do Trato Urinário

(ITU); e “Medidas de Prevenção de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde”, que discute sobre as orientações básicas para a prevenção e o controle de infecção.

Na prática, há recursos humanos insuficientes para o manejo dessas infecções e não há um financiamento específico para o Programa Nacional de Prevenção e Controle de IRAS. WHO (2011) reforça que somente o arcabouço teórico não é suficiente para um controle adequado, sendo necessárias ações homogêneas e eficazes de combate. Sendo assim, medidas intersetoriais mais eficazes são fundamentais para a prevenção e controle de IRAS, com a ação conjunta entre as esferas governamentais, principalmente com campanhas voltadas aos profissionais de saúde e à população em geral.

## **2.2 *Acinetobacter baumannii***

*A. baumannii* é um bacilo não fermentador, gram-negativo, imóvel, oxidase-negativo, cujo reservatório natural ainda não foi determinado. É membro da família Moraxiadae da ordem Gammaproteobacteria, seu gênero possui 26 espécies nomeadas e 9 espécies genômicas, das quais quatro *Acinetobacter* (*Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter piti* e *Acinetobacter hospitalis*) são conhecidos como *Acinetobacter baumannii* complexo de acetato de Bacillus-cálcio por causa de suas características fenotípicas semelhantes. Das espécies citadas, *A. baumannii* é a mais prevalente clinicamente (HOWARD *et al.*, 2012).

Nos últimos 30 anos, o gênero *Acinetobacter* sofreu grandes mudanças taxonômicas, sendo *A. baumannii* o principal representante deste gênero. No ambiente hospitalar ele é encontrado na colonização da pele dos profissionais e paciente internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI), além disso há fatores que podem contribuir para o desenvolvimento de multirresistência antimicrobiana extremamente rápida, como o uso inadequado dos antimicrobianos e a não higienização das mãos dos profissionais de saúde. Portanto, a colonização e/ou infecção por esse agente deve ser detectada precocemente no ambiente hospitalar para que medidas preventivas e terapêuticas adequadas possam ser instituídas. *A. baumannii* é capaz de sobreviver a longos períodos em superfícies secas e esta habilidade, pode contribuir para a sua persistência no cenário hospitalar bem como desenvolver resistência a múltiplas drogas (PONTES *et al.*, 2016).

*A. baumannii* é um patógeno oportunista frequentemente associado a surtos de infecções hospitalares. A bactéria possui gene de resistência com expressão de carbapenemases de ocorrência natural, inerente a esta espécie. O primeiro relato deste evento genético descreveu o gene *bla*-*oxa51*. Posteriormente, foi relatada a existência de variantes semelhantes a esse gene, e essas variantes foram denominadas como genes *bla*-*oxa51*-like. Testes fenotípicos de rotina em laboratórios não conseguem identificar efetivamente as espécies de *Acinetobacter* quando não correlacionados com testes moleculares como PCR (reação em cadeia da polimerase) (TURTON *et al.*, 2006).

Há considerável controvérsia sobre se as infecções causadas por esse organismo levam a desfechos desfavoráveis. No entanto, alguns dados clínicos acreditam que a identificação de *A. baumannii* no paciente hospitalizado seja um indicador de doença grave, com mortalidade associada a aproximadamente 30% (HUANG, Y. *et al.*, 2019). Uma ocorrência de pneumonia adquirida na comunidade associada a alta mortalidade em pacientes no Norte da Austrália e no Sul da Ásia foi descrita. Uma porcentagem significativa dos pacientes nesse estudo (31,6%) apresentava síndrome do desconforto respiratório agudo e coagulação intravascular disseminada. Essas vinhetas clínicas levantam a possibilidade de que alguns isolados possam ter adquirido fatores de virulência que normalmente não são encontrados na maioria dos *Acinetobacter* spp. (CHOI *et al.*, 2015).

Essa bactéria fornece mecanismos para facilitar a colonização de pacientes e equipamentos hospitalares, como a formação de biofilmes por meio da ação de proteínas na membrana externa bacteriana, fator chave na descrição da patogênese desse microrganismo. Além disso, sua capacidade de sobreviver a uma ampla gama de condições ambientais e persistir em superfícies o torna uma causa comum de surtos de infecção hospitalar (PONTES *et al.*, 2016).

Conforme descrito Abbo *et al.*, (2015), há uma prevalência de infecções causadas por *Acinetobacter ssp* multirresistente demonstrando perfis epidemiológicos complexos através da coexistência de vários tipos de cepas. Conforme estudo descrito em Israel por Peleg *et al.* (2008), foram encontrados 10 clones de *Acinetobacter* multirresistentes identificados por testes moleculares e foi identificado entre pacientes que residem em instalações de reabilitação e cuidados de longa duração, bem como em hospitais principalmente nas UTI's. Vários fatores trabalham juntos para manter a presença de espécies de *Acinetobacter* multirresistentes no ambiente de saúde, incluindo a presença de pacientes susce-

tíveis, a presença de pacientes já colonizados ou infectados pelo organismo, pressão seletiva do uso de antimicrobianos e adesão incompleta à infecção procedimentos de controle.

Até a década de 1970, a maioria dos isolados clínicos desse patógeno era suscetível a muitos antibióticos, incluindo os beta-lactâmicos, como carbapenêmicos. No entanto, esse microrganismo possui uma forte capacidade de desenvolver resistência a antibióticos, o que levou a um aumento na incidência de cepas multirresistentes dessa bactéria na última década e está associado a alta mortalidade (FOURNIER *et al.*, 2016).

O aumento global da resistência aos carbapenêmicos neste microrganismo é preocupante, podendo ser verificado na assistência a pacientes hospitalizados na UTI, além disso limita significativamente o leque de opções de tratamento. Uma vez que a produção de carbapenemases é o mecanismo de resistência mais relevante no contexto do surgimento de cepas multirresistentes de *A. baumannii*, torna-se necessário elucidar aspectos clínicos e epidemiológicos da infecção causada por esse patógeno para poder desenvolver o controle e a prevenção de futuros surtos (SMITH *et al.*, 2007).

### **2.3 *Pseudomonas aeruginosa***

Definida como um bacilo gram-negativo, aeróbico que apesar da sua ampla distribuição no ambiente, raramente coloniza seres humanos. Outrossim, em pacientes hospitalizados, a chance de colonização aumenta exponencialmente (ROCHA *et al.*, 2019).

Esta espécie normalmente habita o solo, água e vegetais, e faz parte da microbiota humana, encontrando comumente na garganta, na pele e nas fezes de indivíduos saudáveis. Pode ser considerado oportunista, pois pode causar doenças graves em indivíduos imunocomprometidos (SILVA, 1999).

A faixa de temperatura de crescimento desse patógeno (4°C a 42° C) contribui para sua virulência ao permitir a sobrevivência dele em superfícies inanimadas e ambientes aquáticos, além de sua fácil colonização em hospedeiros humanos e animais. A literatura aponta para o crescimento dessa bactéria no ambiente comunitário, como em piscinas, banheiras, soluções de lentes de contato, umidificadores, solos e produtos agrícolas. Essa contaminação justifica a descrição de infecções comunitárias em pele e tecidos moles, além de ceratites (infecções de córnea) associadas ao uso de lentes de contato e otites

externas que tem o patógeno como causador (SUZUKI *et al.*, 2018; VANDEPLASSCHE *et al.*, 2019).

Em hospitais, essa bactéria é frequentemente encontrada em pias, soluções antisépticas e receptáculos de urina. O processo de transmissibilidade pode acontecer especialmente nos casos de queimadura e em unidades de terapia intensiva neonatais, a menos que práticas de controle de infecção sejam rigorosamente seguidas (LOPES *et al.*, 2020).

Assim como algumas enterobactérias, também é considerada um patógeno oportunista, pois mais de 70% das infecções são nosocomiais ou associadas à saúde, sobretudo em pacientes queimados, imunossuprimidos e naqueles internados em UTIs (LOPES *et al.*, 2020).

A patogenicidade dos bastonetes gram-negativos não fermentadores depende da resistência aos fatores bactericidas do soro, da aderência a células hospedeiras, produção de polissacarídeos, presença de lipopolissacarídeo de parede celular e toxinas extracelulares (MACHADO *et al.*, 2019).

Naturalmente resistente a muitos tipos de antibióticos, especialmente as penicilinas. Por isso, constantemente é descoberta em um cultivo depois de um tratamento malsucedido. Em caso de suspeita de multirresistência, o recomendado é elencar um fármaco para a terapia medicamentosa por meio de um teste de laboratório para descobrir qual antibiótico responde melhor em uma infecção específica (ROCHA *et al.*, 2019).

Destarte, a resistência aos agentes antimicrobianos tem maior expressão devido à redução da permeabilidade de sua membrana externa, à expressão constitutiva de várias bombas de ejeção e produção de enzimas que inativam antibióticos. Sendo que apresenta capacidade de adquirir resistência por mutação e transferência horizontal (FANDINO-MENDEZ *et al.*, 2017).

A transferência de material genético, que ocorre naturalmente intra ou interespecies entre os bacilos gram-negativos, é apontado como um dos principais meios responsáveis pela aquisição de características de resistência. Assim, a capacidade que *P. aeruginosa* possui de tornar-se resistente aos tratamentos é inerente à espécie e muitas vezes, impossível de não ocorrer (LINCOPAN; TRABULSI, 2008).

Além de mecanismos que favorecem a resistência intrínseca a antibióticos como beta-lactâmicos, quinolonas e aminoglicosídeos, as cepas frequentemente apresentam mutações que promovem uma resistência adquirida, as quais conferem resistência a novos



antibióticos. A transferência desses genes de resistência, como as enzimas de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL) e carbapenemases, vem sendo identificadas com maior frequência, sendo comum identificar uma sensibilidade reduzida a múltiplas classes de antibióticos (SUZUKI *et al.*, 2018).

O espectro de doenças causadas por este agente, compreende desde infecções superficiais da pele à sepsé fulminante, podendo causar infecção aguda pela produção de toxinas e infecção crônica pela ação da camada espessa que consiste no seu biofilme, e ainda, pode resultar no somatório dos tipos de infecção pela ação concomitante desses componentes (VANDEPLASSCHE *et al.*, 2019).

#### **2.4 *Stenotrophomonas maltophilia***

*S. maltophilia* é um patógeno oportunista de origem ambiental, que causa infecções graves na unidade hospitalar, infecta principalmente indivíduos gravemente debilitados, tendo como consequência uma alta taxa de mortalidade. As infecções por *S. maltophilia* são difíceis de tratar porque esse patógeno apresenta baixa sensibilidade a vários antimicrobianos, demonstrando ser intrinsecamente resistente a antibióticos comumente usados, associado a longos períodos de internação nas unidades de terapia intensiva (ESPOSITO, *et al.*, 2017).

Conforme descreve Adegoke (2017) *S. maltophilia* é o patógeno gram-negativo resistente a carbapenêmicos mais prevalente entre as infecções da corrente sanguínea em hospitais nos EUA e está associado a significativa morbidade e mortalidade. Além disso, o tratamento é particularmente desafiador devido à produção de múltiplos mecanismos intrínsecos e adquiridos de resistência que tornam ineficazes muitos antimicrobianos de primeira linha, particularmente os  $\beta$ -lactâmicos (STENSTROM, 2017).

A suscetibilidade reduzida de *S. maltophilia* a agentes antimicrobianos é amplamente dependente da presença de genes que codificam bombas de efluxo e enzimas inativadoras de antibióticos em seus cromossomos. Assim, as opções terapêuticas para o tratamento de infecções por *S. maltophilia* são limitadas, portanto, entender as características subjacentes desse patógeno que pode abranger diferentes distribuições ecológicas, desde seu habitat natural até a infecção em seres humanos, podem ajudar a desenvolver estratégias para melhorar o tratamento de infecções causadas por este microrganismo (JEON *et al.*, 2016).



*S. maltophilia* é uma bactéria cosmopolita e ubíqua que existe em uma variedade de habitats ambientais, incluindo ambientes extremos, embora na natureza esteja principalmente associada a plantas. *S. maltophilia* desempenha importantes funções ecossistêmicas na ciclagem de enxofre e nitrogênio, degradação de compostos complexos e poluentes e promoção do crescimento e saúde das plantas. *Stenotrophomonas* sp. também podem colonizar nichos artificiais extremos em ônibus espaciais e salas limpas. *S. maltophilia* emergiu como um patógeno humano oportunista global que normalmente não infecta hospedeiros saudáveis, mas está associado a alta morbidade e mortalidade em indivíduos gravemente imunocomprometidos e debilitados (TERESA; PAULA BLANCO, 2020).

Em relação ao tratamento de infecções por *S. maltophilia*, incluímos trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SMZ) como opção de tratamento, tradicionalmente considerado o tratamento de escolha devido à sua previsível alta suscetibilidade *in vitro*. No entanto, há relatos crescentes de resistência antimicrobiana, reações adversas e falta de dados farmacocinéticos-farmacodinâmicos (PK-PD) confiáveis para otimizar a dosagem, fatores esses que limitam sua aplicação clínica. As fluoroquinolonas são geralmente consideradas a alternativa preferida ao TMP-SMZ, e a maioria dos dados existentes são sobre a levofloxacina. No entanto, os efeitos das fluoroquinolonas, incluindo a levofloxacina, também são limitados pela resistência inicial e emergente à terapia, além de preocupações crescentes de segurança e interações medicamentosas (BADWAL *et al.*, 2019).

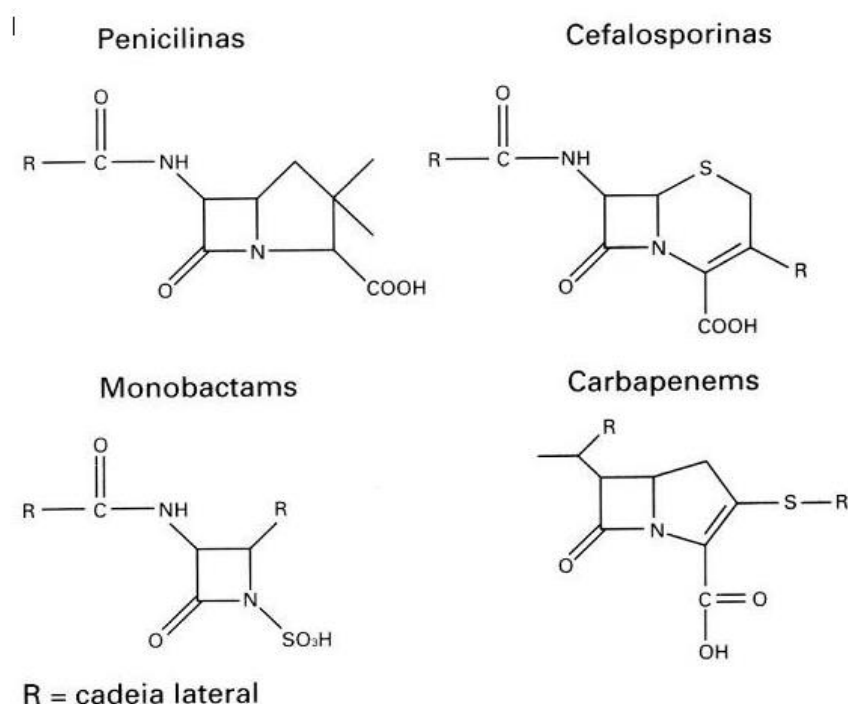
## 2.5 Betalactâmicos

As infecções que são causadas por microrganismos produtores de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) estão aumentando em proporções endêmicas e atualmente representam uma ameaça para a assistência à saúde (RUPPÉ *et al.*, 2015).

Os betalactâmicos é um grupo de antimicrobianos que tem por característica conter um anel beta-lactâmico em sua estrutura básica. O anel beta-lactâmico tem como principal função a de inibir a formação da parede celular bacteriana, sendo o principal responsável pelo mecanismo de ação desses antibióticos. O anel-beta-lactâmico é composto por três átomos de carbono e um de nitrogênio, mas para que tenha atividade ele deve estar ligado a um radical presente na estrutura química, geralmente outro anel (ARRUDA *et al.*, 2019).

Apesar de todas as estruturas desses antibióticos possuírem um anel beta-lactâmico, suas estruturas químicas são diferenciadas, convertendo várias cadeias e se fundido a outro anel em sua estrutura e diferenciando o mecanismo de ação conforme cada estrutura é formada. Nas penicilinas o anel beta-lactâmico se junta com o anel tiazolidina, nas cefalosporinas com o anel dihidrotiazina, e nos carbapenêmicos com o pirrólico. Os monobactâmicos não possuem outro anel em sua estrutura química, são monocíclicos e caracterizados por conter o grupo 2-oxoazetidina-1-sufóni (WILLIAMS, 1999; ARRUDA *et al.*, 2017).

**Figura 1:** Representação da estrutura química de cada classe da subfamília dos Beta-Lactâmicos.



Fonte: Williams, 1999; Arruda *et al.*, 2017.

As beta-lactamases podem ser encontradas de forma extracelularmente em bactérias Gram-positivas, ou no espaço periplasmático em bactérias Gram-negativas. Os genes que produzem essas enzimas podem estar localizados no cromossomo bacteriano ou em plasmídeo. As beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) são um grupo de enzimas mediadas por plasmídeo, que codificam resistência a diversos beta-lactâmicos, e a outros agentes antimicrobianos, como aminoglicosídeos e quinolonas, e se diversificam de forma rápida em sua evolução, pois são capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas

de amplo espectro, monobactâmicos e carbapenêmicos, havendo alterações químicas em cada grupo que transformam as características dos antibióticos como afinidade por receptor, espectro de ação, e diferentes formas de resistência desenvolvidas pelas bactérias (BRADFORD, 2001; FERNANDO *et al.*, 2017).

**Quadro 1:** Características dos antibióticos beta-lactâmicos.

Penicilinas	Esses antibióticos (a maioria dos quais termina no sufixo <i>-cilina</i> ) contêm um núcleo de anel de ácido 6-animopenicilânico (lactama mais tiazolidina) e outras cadeias de anéis. O grupo inclui penicilinas naturais, agentes resistentes à beta-lactamase, aminopenicilinas, carboxipenicilinas e ureidopenicilinas.
Cefalosporinas	Eles contêm um núcleo de ácido 7-aminocefalosporânico e uma cadeia lateral contendo anéis de 3,6-di-hidro-2H-1,3-tiazano. As cefalosporinas são tradicionalmente divididas em cinco classes ou gerações, embora a aceitação dessa terminologia não seja universal.
Carbapenêmicos	Sua estrutura definidora é um carbapenem acoplado a um anel beta-lactâmico que confere proteção contra a maioria das beta-lactamases, embora a resistência a esses compostos seja um problema significativo e ocorra principalmente entre patógenos Gram-negativos (por exemplo, <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Acinetobacter baumannii</i> ) que produzem diferentes classes de beta-lactamases denominadas como carbapenemases.
Monobactamicos	O anel beta-lactâmico fica sozinho e não é fundido a outro anel.

Fonte: Pandey; Cascella, 2021

A resistência aos beta-lactâmicos tem sido descrita cada vez mais na literatura e demonstrada nos perfis de sensibilidade das unidades hospitalares. A resistência a esses antimicrobianos é um fenômeno preocupante pelo crescimento presente nas unidades de saúde, fazendo-se necessário verificar os principais mecanismos de resistência, pois isso ajudará nas práticas clínicas, pois além da produção de beta-lactamases, há outros mecanismos como diminuição de penetração da droga, alteração do sítio alvo e dos mecanismos de bombeamento específicos (ECKBURG *et al.*, 2019).

A produção enzimática é o principal mecanismo para obtenção de resistência a  $\beta$ -lactâmicos. A afinidade estrutural do anel  $\beta$ -lactâmico é partilhado com as enzimas  $\beta$ -lactamases, que se tornam capazes de se ligar, acilar e hidrolisar o anel  $\beta$ -lactâmico, inativando-o. Segundo a classificação de Ambler, há 4 classes de  $\beta$ -lactamases estabelecidas: Classe A, B, C e D, sendo que as classes A, C, D têm o seu núcleo à base de serina

enquanto que a classe B necessita de um íon metálico no seu centro ativo para conseguir hidrolisar o seu substrato (DRISCOLL *et al.*, 2007; TAVARES, 2020).

- a)  $\beta$ -lactamases de Largo Espectro (ESBL) – são  $\beta$ -lactamases de classe A e representam a maior classe em adquirir resistência, em relação às demais  $\beta$ -lactamases. Essas enzimas são consideradas hidrolíticas e demonstram atividade contra todos os  $\beta$ -lactâmicos, exceto aos carbapenêmicos, sendo inibidas em grande parte pelo ácido clavulânico e tazobactam (STRATEVA; YORDANOV, 2009; TAVARES, 2020).
- b) Classe B: Metallo- $\beta$ -Lactamases (MBLs) - são carbapenemases de classe B, foram inicialmente encontradas em cepas de *Klebsiella pneumoniae*, e depois em *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. As MBLs dependem de zinco, pois o utilizam para hidrolisar o anel azetidina dos beta-lactâmicos, podendo promover resistência a beta-lactâmicos como penicilinas e cefalosporinas (TOKAR; BEDENIC, 2018).
- c) Classe C: AmpC  $\beta$ -Lactamase - A AmpC é uma beta-lactamase com características de resistência a múltiplos fármacos, tendo origem cromossomal ou em plasmídeos, que podem ser transferidos entre bactérias diferentes, principalmente da família *Enterobacteriaceae*, que são caracterizados pela presença do gene *bla*<sub>AmpC</sub> (AKINYEMI *et al.*, 2017).
- d) Classe D: Oxa-beta-lactamase – Também chamada de oxacilinas, fazem parte de um grupo bastante heterogêneo de  $\beta$ -Lactamases, entretanto apenas uma pequena parcela é capaz de hidrolisar carbapenêmicos. Normalmente são encontradas em cepas de *Acinetobacter baumannii*, porém já foi descrita em enterobactérias (LAHEY, 2017).

## 2.6 Carbapenemases

Na década de 70, a descoberta por meio da fermentação de um fungo, *Streptomyces cattleya*, deu origem a uma nova classe de antimicrobianos que agrupam compostos que variam na estrutura química, resistência à ação beta-lactâmica, espectro de ação e na habilidade em inibir ou induzir a produção de beta-lactamases, os carbapenêmicos (LIMA *et al.*, 2021).

Os carbapenêmicos podem ser utilizados para o tratamento de infecções graves, como infecções intra-abdominais e do trato urinário complicadas, infecções de pele, pneumonias, meningites e neutropenia febril (FERNANDES, 2016).

A epidemiologia molecular das bactérias resistentes aos carbapenêmicos tem sido amplamente investigada. No entanto, a maioria das informações disponíveis vem de estudos que avaliaram bactérias específicas ou tipos específicos de infecção. Há três tipos de carbapenêmicos utilizados na clínica médica, o imipenem, meropenem e ertapenem. Os beta-lactâmicos dessa classe possuem maior espectro de ação, sendo indicados para o tratamento de infecções causadas por gram-negativos, gram-positivos, anaeróbicos, organismos produtores de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) e AmpC, embora não tenham eficácia contra *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina e *Stenotrophomonas maltophilia* (LIMA *et al.*, 2021).

São fármacos bem tolerados e devem ser administrados por via endovenosa ou via intramuscular, pelo fato de não serem absorvidos por via oral. O imipenem-cilastatina pode reduzir o limiar convulsivo, levando ao aparecimento de convulsões, principalmente em pacientes idosos, com alteração da função renal ou cuja doença de base predisponha a convulsões (BRASIL, 2017).

Tais efeitos são menos identificados durante o uso de meropenem. Dentre as alterações laboratoriais, estudos apontam aumento de transaminases, alterações hematológicas, sendo as mais comuns trombocitose e eosinofilia, reações gastrintestinais, principalmente náuseas e vômitos. Pode ainda, acontecer uma reação cruzada em pacientes alérgicos à penicilina. Com um amplo espectro de ação para uso em infecções sistêmicas e estáveis à maioria das beta-lactamases, também conseguem atuar nos tecidos abdominais, respiratórios, bile, trato urinário, líquido e órgãos genitais (BRASIL, 2017).

Com base em sua estrutura molecular, as carbapenemases são classificadas em enzimas de classe A, B ou D. As tabelas 1 e 2 resumem o espectro de ação dos principais representantes dos carbapenêmicos e a descrição das três classes, respectivamente.

**Tabela 1** – Relação do espectro de ação dos principais representantes dos carbapenêmicos

Microorganismo	Carbapenêmicos		
	Meropenem	Imipenem	Ertapenem
<i>Streptococcus</i>	X	X	X
<i>Staphylococcus</i>	X	X	X

MRSA			
<i>Enterococcus/VRE</i>			
ESBL	X	X	X
KPC			
<i>Pseudomonas</i>	X	X	
<i>Acinetobacter</i>	X	X	
Anaeróbios	X	X	X

Fonte: Moellering, *et al.*, 2018.

Entre os gram-positivos, têm ação apenas contra *Staphylococcus* sp. e *Streptococcus* sp. sensíveis, ou seja, *S. aureus* resistente à metilina-oxacilina estão de fora, assim como os *Enterococcus* sp., sejam resistentes à vancomicina ou não. Entre os gram-negativos, possuem ação contra praticamente todas as enterobactérias, algumas das não-enterobactérias como *Neisseria* sp., *Haemophilus influenzae*, parte dos não fermentadores, como *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e anaeróbios como os Bacteroides sp. e *Fusobacterium* sp. (MOELLERING *et al.*, 2018).

Os cabapênêmicos tendem a ter uma ação efetiva contra bactérias gram-negativas, porém, o imipenem apresenta atividade antimicrobiana um pouco superior contra gram-positivos. O meropenem é mais ativo contra bactérias gram-negativas, ao passo que, o ertapenem não tem atividade contra *P. aeruginosa* e *A. baumannii*. Assim cada antimicrobiano deve ser avaliado de acordo com o foco e o agente etiológico da infecção.

**Tabela 2** – Classificação das três classes de carbapenemases

Classes	Subclasses	Exemplos	Inibição pelo clavulanato
A		NMC-A	Sim
		IMI-1, IMI-2	Sim
		SME-1, SME-2, SME-3	Não
		KPC-2, KPC-3	Sim
B		GES-2, GES-4, GES-5, GES-6	Sim
	B1	NDM, IMP, VIM, GIM, SPM, CcrA	Não
	B2	CphA	Não
	B3	L1, FEZ-1, GOB-1, CAU-1	Não
D		OXA-23, OXA-40, OXA-48, OXA-50, OXA-51, OXA-55, OXA-58, OXA-60,	Variável

### 2.6.1 Carbapenemases classe A

As carbapenemases dessa classe molecular, são consideradas serina carbapenemases e correspondem ao grupo funcional 2f. Possuem capacidade de hidrolisar penicilinas, carbapenêmicos, cefalosporinas, e monobactâmicos, pois tem como principal característica uma serina como seu principal resíduo catalítico, localizada no seu sítio ativo, e contêm os tipos KPC (*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase), NMC (Não Metalo carbapenemase), IMI (*Imipenem hydrolyzing* carbapenemase), SME (*Serratia marcescens* enzyme) e GES (*Guiana extended spectrum*). Os vários tipos de carbapenemases de classe A começaram a ser notificados a partir de 1982 (SME), 1984 (IMI), 1990 (NMC), 1996 (KPC) e 2000 (GES). As GES, carbapenemases da classe A, têm sua capacidade hidrolítica aumentada dependendo do seu subtipo GES-1/2/3/4/5 (POIREL *et al.*, 2001; SMITH *et al.*, 2012).

Algumas enzimas de carbapenemases de classe A, apresentam um maior espectro de ação, incluindo todas as penicilinas e cefalosporinas, além dos monobactâmicos, e são inibidas normalmente pelo ácido clavulânico. Outra principal característica relevante da classe é a sua inibição pelo ácido fenilborônico, o qual tem sido utilizado para a detecção fenotípica dessas enzimas (BAE *et al.*, 2007).

Modificações nos aminoácidos, fizeram com que suas variantes passassem a ter maior afinidade pelos carbapenêmicos, especialmente imipenem. Nas enterobactérias, a variante com atividade de carbapenemase mais relevante é a GES-5, sendo que, no Brasil, ela já foi descrita nos ambientes hospitalares (RIBEIRO *et al.*, 2014).

### 2.6.2 Carbapenemases classe B

As carbapenemases da classe B tem como principal fator enzimático a dependência de zinco ( $Zn^{+2}$ ), são denominadas, portanto, metalo  $\beta$ -lactamases (M $\beta$ Ls). Com subtipos GIM (*German Imipenemase*), VIM (*Verona Imipenemase*), IMP (*Imipenemase*), SPM (*São Paulo Metalobetalactamase*), AIM (*Australian Imipenemase*) e NDM (*New Deli Metalobetalactamases*) (QUEENAN, BUSH, 2007; CHARAN, *et al.*, 2012).

As MβLs podem ter origem plasmidial ou cromossomal. As plasmidiais descritas, têm-se: VIM (Verona imipenemase), IMP (imipenemase), SPM (São Paulo metalo β-lactamase), SIM (Seoul imipenemase), GIM (German imipenemase) e NDM-1. Tendo maior destaque e reporte mundial IMP, VIM e NDM (ANDRADE, 2011). Já as cromossomais que foram relatadas inicialmente, estavam presentes em *Bacillus cereus*, *Aeromonas* spp. e *S. maltophilia* (LÓPEZ, 2014).

A primeira MβL plasmidial descrita foi (IMP-1), em 1988 no Japão que foi isolada de *P. aeruginosa* (WATANABE *et al.*, 1991). Desde então, IMP propagou-se mundialmente, sendo detectada em *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. e várias enterobactérias (MARTÍNEZ-MARTÍNE *et al.*, 2014). A importância das MBLs na família *Enterobacteriaceae* aumentou rapidamente, após o isolamento da primeira *K. pneumoniae* produtora de NDM, em um paciente sueco que havia estado na Índia (YONG *et al.*, 2009).

### 2.6.3 Carbapenemases classe D

E, por último, as Oxacilinas que são encontradas na Classe D, pertencem ao subgrupo funcional 2df, que hidrolisam oxacilina ou cloxacilina e carbapenêmicos, para estes últimos apresentam uma taxa de hidrólise muito baixa, quando comparada às outras classes, além disso o ácido clavulânico ou tazobactam possuem atividade variável na inibição das OXAs (DJAHMI *et al.*, 2014).

Da mesma forma das carbapenemases da classe A, as de classe D apresentam serino-enzimas. Em enterobactérias, as carbapenemases de classe D mais conhecidas são do subtipo OXA-48, o qual, está difundido em outros países, apesar de não ser prevalente no Brasil (SMITH *et al.*, 2012; POIREL *et al.*, 2001). As Oxacilinas podem estar associadas a outros mecanismos de beta-lactamases, como CTX-M. Além da OXA-48 existem muitos outros subtipos, como OXA-23, OXA-146, OXA-40, OXA-58, OXA-24 e OXA-40, normalmente são encontradas em cepas não fermentadoras, como é o caso de *P. aeruginosa*. As diferenças entre elas são estruturais e acabam refletindo em níveis diferentes de resistência (KAITANY *et al.*, 2013).

Algumas dessas enzimas da classe D são apenas β-lactamases de espectro estendido, não apresentando a capacidade de hidrólise de carbapenêmicos. Já as que possuem esta atividade são principalmente: OXA-23, OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA 27, em especial, OXA-48 (DJAHMI *et al.*, 2014).



## 2.7 *mcr-1* e *mcr-2*

As polimixinas, colistina e polimixina B, são os antibióticos de “última escolha” para o tratamento de infecções por bactérias multirresistente, e em 2012 a colistina foi reclassificada pela OMS como criticamente importante para a medicina humana (NEWTON *et al.*, 2017).

O gene *mcr-1* é especialmente temido porque torna as bactérias resistentes à colistina, a ocorrência do gene de resistência à colistina mediado por plasmídeo *mcr-1* foi relatada em todo o mundo, observado em uma variedade de espécies de enterobactérias de amostras humanas, ambientais, animais e alimentos. Segundo Xavier (2016), foi identificado um novo gene que codifica a fosfoetanolamina transferase mediado por plasmídeo, *mcr-2*, com prevalência ainda maior do que a de *mcr-1* entre *E. coli*. Portanto, os cientistas têm monitorado a disseminação desses genes em todo o mundo desde que ele foi descoberto em humanos, aves e suínos na China em 2015 (POIREL, JAYOL, NORMANN, 2017).

A colistina é uma molécula policatiônica que atua diretamente na membrana bacteriana externa deslocando cátions divalentes dos grupos fosfatos carregados negativamente pelo lipídio A da membrana do lipopolissacarídeo, resultando na ruptura da membrana celular, que tradicionalmente induz a resistência à colistina, pois foi considerada ativa, devida a raras mutações cromossômicas nos genes que codificam os sistemas de sinalização de dois componentes PmrA / PmrB e PhoP / PhoQ ou o regulador negativo MgrB (OLAITANET, MORAND *et al.*, 2014; NEWTON *et al.*, 2017).

Os genes *mcr-1* e *mcr-2*, foram caracterizados em uma variedade de origens genômicas. Até o momento, *mcr-1* foi observado em uma ampla variedade plasmidial (MATAMORO *et al.*, 2017). Buscas intensas em descobrir o gene *mcr-1* e *mcr-2*, mostraram que são prevalentes em reservatórios ambientais, como em águas recreativas, praias urbanas públicas, e amostras fecais de indivíduos saudáveis. Embora o Brasil já tenha banido o uso de colistina na agricultura, há evidência de que o *mcr-1* pode se disseminar dentro de ambientes hospitalares, por conta do uso do antimicrobiano, assim como na comunidade (WANG *et al.*, 2017).

Esses mecanismos de resistência em plasmídeos se mantêm estáveis em sua forma de adaptação, podendo ser transferidos entre cepas bacterianas e, portanto, representam um risco para o tratamento de infecções gram-negativas graves. A distribuição desses

plasmídeos entre os organismos resistentes aos carbapenêmicos, especialmente no ambiente hospitalar, pode catalisar um retorno da “era pré-antibiótica” para o tratamento de infecções por patógenos bacterianos gram-negativos (LIU *et al.*, 2016).

Dessa forma, a descoberta de resistência à colistina mediada por plasmídeo despertou preocupação mundial, pois a disseminação dessa resistência poderá prejudicar tratamentos eficazes com esse fármaco em seres humanos. Sabe-se que os genes de resistência mediados por plasmídeo têm capacidade de se disseminar internacionalmente, principalmente em locais onde já há altas taxas de disseminação de microrganismos multirresistentes, tornando-se um problema de saúde pública. Assim, as infecções humanas para as quais as opções terapêuticas foram esgotadas, terão apenas a colistina como tratamento, caso haja resistência a esse antimicrobiano, não haveria mais como tratar essas infecções em ambientes nosocomiais (REBELO *et al.*, 2018).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Realizar estudo genômico para identificação de genes responsáveis pelo padrão de resistência a antibióticos Beta-lactâmicos e Polimixinas em bacilos gram-negativos não fermentadores isolados de pacientes com IRAS assistidos no Hospital Regional Norte (HRN) em Sobral – CE.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Verificar a frequência de IRAS por *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e *S. maltophilia* no HRN;
- Verificar os setores hospitalares do HRN com maior prevalência desses patógenos, descrever os sítios de coleta, o perfil e o desfecho clínico dos pacientes infectados por *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e *S. maltophilia*;
- Investigar o perfil de resistência antimicrobiana de *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e *S. maltophilia* isolados de pacientes com IRAS no HRN;
- Identificar a ocorrência dos genes de resistência de *bla*<sub>KPC2</sub>, *bla*<sub>oxa143</sub> e *mcr-1* em *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e *S. maltophilia* isolados de pacientes com IRAS no HRN.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Coleta e identificação dos Isolados Bacterianos

A coleta e identificação dos isolados bacterianos ocorreu entre os meses de março de 2021 a março de 2022, sendo realizada em parceria com os profissionais do laboratório de referência (São Carlos Imagem) para o HRN. Os isolados foram coletados de amostras clínicas de sangue, de infecções do trato respiratório, ponta de cateter percutâneo, secreção de abscesso e de ferida cirúrgica, dentre outros materiais biológicos que surgiram como demanda do próprio hospital, isso porque essas amostras foram oriundas de solicitações da equipe médica. A identificação foi realizada através do sistema automatizado Vitek<sup>®</sup> 2 (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, França).

Nesse sentido, é válido ressaltar, que não foi feita coleta de material no paciente em razão da pesquisa. Logo, a quantidade e manipulação de qualquer amostra coletada, bem como a manipulação e armazenamento seguiram o protocolo operacional padrão do hospital que já é amplamente utilizado e se mostra eficaz, assim como o método de descarte das amostras biológicas que seguiu o plano de gerenciamento de resíduos de serviço de saúde de acordo com a Resolução RDC N<sup>o</sup>306 de 07 de dezembro de 2004.

De forma periódica foi realizado contato com a equipe de microbiologistas do referido laboratório para a separação dos isolados bacterianos, que foram armazenados em tubos contendo *Brain Heart Infusion* (BHI) com glicerol a 20% em condições de temperatura adequada (2 a 8°C) de forma a preservar a sua integridade e estabilidade, bem como a segurança do pessoal envolvido durante o processo de transporte das espécies bacterianas para o laboratório de Microbiologia da UFC em Sobral. A coleta das amostras se deu sob a responsabilidade do pesquisador, bem como o armazenamento durante o percurso que obedeceu às normas de biossegurança, de forma a prevenir riscos de exposição direta, dos transportadores, da população e do ambiente, de acordo com a RDC N<sup>o</sup> 20 de 10 de abril de 2014.

### 4.2 Critérios de Inclusão e Exclusão

Para os critérios de inclusão foram considerados:

- Todos os isolados previamente identificados como *P. aeruginosa*, *A. bau-*

*mannii* e *S. maltophilia* por meio do sistema automatizado VITEK®2 (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, França) no laboratório de destino habitual (São Carlos imagem, Fortaleza - CE) a partir das amostras de pacientes atendidos no HRN;

- Cepas processadas adequadamente que mantiveram a viabilidade apropriada para os estudos genéticos;
- Culturas de pacientes que aceitaram em participar do estudo, mediante TCLE (Apêndice I) assinado pelo próprio ou seu responsável;
- Culturas de infecções nosocomiais: infecções adquiridas em ambiente hospitalar segundo critérios médicos e laboratoriais;

Já para os critérios de exclusão foram os isolados que não corresponderam aos critérios supracitados, ou seja, que não apresentaram viabilidade para a execução dos experimentos moleculares, e aqueles cujos os pacientes ou seus responsáveis não assinaram o TCLE dando consentimento para a participação na pesquisa.

#### **4.3 Teste de Suscetibilidade Antimicrobiana (TSA)**

O teste de suscetibilidade antimicrobiana foi executado utilizando o método de Microdiluição no sistema automatizado VITEK®2 (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, França) de acordo com as instruções do fabricante. Os isolados foram cultivados em Agar MacConkey e incubados a 37°C durante 24 horas. Após crescimento bacteriano, foi realizado preparo padronizado da suspensão bacteriana e o inóculo, logo após introduzido no equipamento através de uma microtubulação por aspiração. A suspensão foi automaticamente dirigida para um cartão plástico fechado com 64 poços contendo concentrações específicas de antimicrobianos liofilizados que disponibilizava o resultado de Concentração Inibitória Mínima (CIM). O VITEK®2 possui *software* específico que emite relatório das análises (BRAGA, 2016; BRITO, 2018).

#### **4.4 Reativação dos isolados bacterianos**

A reativação dos espécimes armazenados em freezer -80°C foi realizada acrescentando-se uma alíquota 50µl da cultura em glicerol em um tubo de ensaio contendo 5,0 ml de caldo BHI e mantido em estufa bacteriológica por 18 horas a 37°C, um tubo para cada amostra e mais um tubo de controle positivo e um controle negativo. Após crescimento,

o inoculo foi semeado em placa com Ágar MacConkey utilizando-se uma alça bacteriológica estéril e colocado em estufa novamente a 37°C, por 24h, juntamente com uma placa sem sementeira como controle negativo de contaminação dos meios ou da própria estufa. Após crescimento, foi confirmada a pureza da amostra com a observação das características morfo-tintoriais através da coloração de Gram (ROCHA, 2015; BRAGA, 2016; BRITO, 2018).

## 4.5 Estudo Genômico

### 4.5.1 Extração do DNA cromossômico

Após o crescimento do microrganismo em um meio líquido, estes foram recuperados por centrifugação a 4.500 g por 2 min e ressuspensos em 200 µl do tampão 1 (2% Triton X 100, 1% SDS, 10 mM Tris / HCl (pH 8), 1 mM EDTA, 100 NaCl mM). Finalmente, 200 µl de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25: 24: 1) foi acrescentado no recipiente. Após agitação das amostras durante 4 min, 200 µl do tampão 2 foram adicionados (10 mM Tris / HCl (pH 8), EDTA 1 mM). As amostras foram centrifugadas (12.000 g) por 6 min e o DNA extraído, o sobrenadante foi precipitado pela adição de etanol (1 ml) e centrifugado a 12.000 g por 2 min. O sedimento foi ressuspenso em 400 µl de tampão 2 e o RNA foi removido pela adição de 30 µl de RNase (1 mg / ml) e incubação por 5 min a 37°C. A reação foi interrompida com a adição de 10 µl de acetato de amônio (4 M) e o DNA novamente precipitado como descrito anteriormente. O sedimento foi seco no ambiente e dissolvido em 50 µl de tampão 2. O rendimento do DNA foi determinado espectrofotometricamente usando um Biofotômetro (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) - (AUSUBEL *et al.*, 2002).

### 4.5.2 Extração do DNA plasmidial

Após 18 h de incubação, 0,5 ml de cultura bacteriana foi transferida para um tubo Eppendorf de 1.500 µl para extração do plasmídeo, e o restante foi armazenado a -20° C após a adição de glicerol a 40%. Todas as manipulações foram realizadas em temperatura ambiente, a menos que indicado de outra forma. O tubo foi centrifugado por 15 segundos. O sobrenadante foi cuidadosamente removido com um aspirador de ponta fina e o pellet celular foi completamente suspenso em 100 µl de solução I. Após 30 min de incubação a 0 ° C, 200 µl de solução II foram adicionados e o tubo foi suavemente agitado

em vórtex. A suspensão deverá ficar quase límpida e ligeiramente viscosa. O tubo foi mantido por 5 min a 0 °C e então 150 µl de solução III para pesquisa de ácidos nucleicos foi adicionada. O conteúdo do tubo foi misturado suavemente por inversão por alguns segundos durante os quais um coágulo de DNA se formou. O tubo foi mantido a 0 °C por 60 min para permitir que a maior parte da proteína, RNA de alto peso molecular e cromosomal pudesse precipitar. Centrifugação por 5 min rende um sobrenadante quase claro. Quatro décimos de um ml do sobrenadante foram removidos e transtransferidos para um segundo tubo de centrífuga. Pequenas quantidades de material flutuante puderam ser transferidos neste momento. 1ml de etanol frio foi adicionado e o tubo foi mantido a -20° C durante 30 min. O precipitado foi coletado por centrifugação por 2 min e o sobrenadante removido por aspiração. O pellet foi dissolvido em 100 µl de acetato de sódio 0,1 M / Tris-HCl 0,05 M (pH 8) e reprecipitado com 2 volumes de etanol frio. Após 10 min a -20°C, o precipitado foi novamente coletado por centrifugação como antes. O sedimento foi dissolvido em 40 µl água e, em seguida, 10 µl de 5 x tampão de amostra foram adicionados. 10 a 20 µl foi aplicado a um gel de agarose para análise eletroforética (BIRNBOIM; DOLY, 1979).

#### 4.6 Detecção e identificação dos genes de resistência por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Os espécimes *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e *S. maltophilia* foram analisados para a detecção dos genes *bla* KPC-2, *bla* OXA-143 e *mcr* - 1. Os *primers* e protocolos que foram usados são descritos no Quadro 2 sendo usados para amplificação desses genes que já foram previamente relatados por Liu *et al.*, (2015), Nicoletti, (2014) e Higgins *et al.*, (2010), em seguida foram visualizados por meio de Eletroforese em gel de agarose.

**Quadro 2** – Primers utilizados para amplificação dos genes de resistência deste estudo.

Primer	Sequência de Nucleotídeos (5' - 3')	Tamanho do ampL	Referências
<i>bla</i> KPC-2 - F	TCGCTAAACTCGAACAGG	762pb	NICOLETTI, 2014
<i>bla</i> KPC-2- R	TTACTGCCCGTTGACGCCCAATCC		

<i>mcr - I - F</i>	CGGTCAGTCCGTTTGTTTC	308 pb	LIU <i>et al.</i> , 2015
<i>mcr - I - R</i>	CTTGGTCCGGTCTGTAGGG		
<i>blaOXA-143 -F</i>	TGGCACTTTCAGCAGTTCCT	149 pb	HIGGINGS <i>et al.</i> , 2010
<i>blaOXA-143 - R</i>	TAATCTTGAGGGGGCCAAG		

#### 4.7 Análise Estatística

A análise estatística para a avaliação quantitativa nominal dos dados foi realizada através do teste do Qui-Quadrado (Software GraphPad, San Diego California USA), e quando não possível, exato de Fisher (Software SPSS v20.0, 2022). Diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$  e o intervalo de confiança utilizado para avaliação do risco relativo for de 95%.

Todos os resultados sobre as características genéticas de resistência das bactérias de interesse desse estudo foram demonstrados através de tabelas.

#### 4.8 Aspectos éticos

Para atender aos aspectos éticos da pesquisa envolvendo seres humanos e partindo da compreensão que para o desenvolvimento de estudos em saúde requer rigor metodológico e ético, a pesquisa foi orientada conforme a resolução N° 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS), que estabelece as normas e diretrizes de pesquisa em seres humanos. Foram obedecidos os princípios éticos do respeito pela pessoa (autonomia e proteção de grupos vulneráveis), beneficência, não maleficência e justiça. Dessa forma, a pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Regional Norte (HRN) e obteve Parecer Aprovado (4.313.543) – Anexo 01.

Os sujeitos da pesquisa tiveram suas identidades preservadas e eles ou seus responsáveis assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) sobre sua participação neste trabalho de pesquisa. O procedimento incorreu em riscos mínimos para



os pacientes, uma vez que foi assegurada a confidencialidade e a privacidade, e a não estigmatização, garantindo a não utilização das informações em prejuízo das pessoas e/ou das comunidades, e que o material biológico e os dados obtidos na pesquisa foram utilizados exclusivamente para a finalidade prevista no seu protocolo e conforme acordado no TCLE (Apêndice I).

É válido ressaltar que os pacientes foram beneficiados, na medida em que os microrganismos multirresistentes foram identificados a partir das amostras coletadas. Além disso, a equipe médica tomou conhecimento do patógeno e do seu perfil de resistência a antibióticos, facilitando o tratamento desses indivíduos.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De março de 2021 a março de 2022 foram isolados 119 bacilos gram-negativos não fermentadores (BGN-NF) de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) de pacientes internados no Hospital Regional Norte em Sobral/CE. As amostras foram processadas no laboratório São Carlos Imagem e analisadas no laboratório de microbiologia da UFC (LM/UFC) em Sobral. Dentre os BGN-NF foram identificados *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e *S. maltophilia*, com uma maior prevalência de *P. aeruginosa* (42,9%). Contudo, não foi observado diferença estatisticamente significativa na frequência dos BGN-NF isolados a partir de IRAS no HRN (Tabela 3).

**Tabela 3** – Frequência de BGN-NF isolados de pacientes com IRAS no HRN

<i>Microrganismo</i>	<i>n</i>	<i>%</i>	<i>P - valor</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	51	42,9	0,139
<i>Acinetobacter baumannii</i>	48	40,3	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	20	16,8	
<b>Total</b>	<b>119</b>	<b>100</b>	

Fonte: Dados analisados através do software SPSS v20.0, (2022).

*P. aeruginosa* tem sido descrita na literatura como agente causador de IRAS em unidades de terapia intensiva e está diretamente envolvida no desenvolvimento de necrose tecidual e pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) (MENDONÇA *et al.*, 2019).

Além disso, como observado com os achados dessa pesquisa, *A. baumannii*, anteriormente considerado de baixa virulência, recentemente se destacou como um dos principais microrganismos identificados como causa de IRAS. Esse microrganismo tem se destacado frequentemente nas infecções hospitalares devido à sua grande resistência a medicamentos, podendo causar muitas infecções em pacientes na UTI, como sepse, bacteremia, meningite e infecções de feridas. Ainda segundo Silva *et al.*, (2021), os carbapenêmicos são as primeiras drogas de escolha para o tratamento dessas infecções, mas devido à resistência desses microrganismos à colistina, tem sido a única opção terapêutica.

Os patógenos predominantes verificados em pacientes internados nas unidades hospitalares são os bacilos gram-negativos, *P. aeruginosa* está entre os principais, além disso há uma prevalência também de espécies de *Enterobacteriaceae*, como *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia* e *Escherichia coli*, considerando que esses microrganismos são os mais presentes quando se analisam os estudos e dados do perfil epidemiológico brasileiro (MARTINS *et al.*, 2008).

**Tabela 4** – Perfil epidemiológico dos pacientes com IRAS infectados com BGN-NF no HRN

	Total		A. <i>baumannii</i>		P – valor	P. <i>aeruginosa</i>		P – valor	S. <i>maltophilia</i>		P – valor
	n	%	n	%		n	%		n	%	
<b>Gênero</b>											
Feminino	57	47,9	20	41,6	0,895	24	47,1	0,648	13	65	0,699
Masculino	62	52,1	28	58,4		27	52,9		07	35	
<b>Total</b>	<b>119</b>	<b>100</b>	<b>48</b>	<b>100</b>		<b>51</b>	<b>100</b>		<b>20</b>	<b>100</b>	
<b>Idade</b>											
0-20	18	15,1	7	14,5	0,519	8	15,6	0,710	3	15	0,413
21-40	8	5	3	6,4		3	6,7		2	10	
41-60	24	21	10	20,8		10	19		4	20	
61-80	45	37,8	18	37,5		19	37,2		8	40	
>80	24	21,1	10	20,8		11	21,5		3	15	
<b>Total</b>	<b>119</b>	<b>100</b>	<b>48</b>	<b>100</b>		<b>51</b>	<b>100</b>		<b>20</b>	<b>100</b>	

Fonte: Dados analisados através do software SPSS v20.0, (2022).

Dos 119 indivíduos, 62 (52,1%) eram homens e 57 (47,9%) mulheres. Tendo sido observada uma maior ocorrência de infecções por BGN-NF entre pacientes do gênero masculino. Em relação aos microrganismos identificados, *A. baumannii* foi isolado em 58,4% e *P. aeruginosa* em 52,9% de pacientes do gênero masculino, enquanto foi observado uma maior prevalência de *S. maltophilia* (65%) no gênero feminino, embora esses dados não tenham sido estatisticamente significantes (Tabela 4).

Em relação à idade, houve uma maior detecção de BGN-NF em IRAS de pacientes na faixa etária de 61 a 80 anos (37,8%), tendo sido esse fato comum para os diferentes patógenos analisados. Verificando-se dessa forma, que os mais idosos estão mais vulneráveis a essas infecções nosocomiais (Tabela 4).

Conforme Elliott, *et al.* (2020), no idoso, estas infecções assumem uma importância maior em decorrência da gravidade do quadro clínico destes quando internados. Um

estudo realizado por Silva (2021) na Irlanda no final de abril e início de maio de 2020, identificou que a infecção nosocomial foi o evento mais prevalente, ocorrendo em 21,8% da amostra analisada, a frente de acidentes e lesões, observados em 11,6% dos casos. Importante destacar que as infecções mais comuns eram relacionadas ao trato respiratório e urinário, acometidas por *Klebsiella ssp*, *A. baumannii* e *P. aeruginosa*.

No Brasil, dados do *Antimicrobial Surveillance Program* - SENTRY demonstraram que o patógeno *P. aeruginosa* foi mais frequentemente isolado em pacientes internados nas unidades de terapia intensiva e o sétimo patógeno mais comum em infecções da corrente sanguínea. Durante as últimas quatro décadas, *P. aeruginosa* foi responsável por 10% de todas as infecções nosocomiais (FERRAREZE, 2007).

**Tabela 5** – Diagnóstico de Admissão dos pacientes com IRAS infectados com BGN-NF no HRN

	Total		A. <i>baumannii</i>		P - valor	P. <i>aeruginosa</i>		P - valor	S. mal- <i>tophilia</i>		P - valor
	n	%	N	%		n	%		n	%	
Abdomen agudo	1	0,8	1	2	0,939	0	0	0,736	0	0	0,312
AVC*	1	0,8	0	0		1	1,9		0	0	
DPOC**	15	12,6	11	22,9		4	2,9		0	0	
DCR aguda***	9	7,5	4	8,3		5	9,8		0	0	
Desidratação	1	0,8	0	0		1	1,9		0	0	
Dor abdominal e pélvica	16	13,4	5	10,4		8	15,6		3	15	
GECA****	14	11,7	4	8,3		8	15,6		2	10	
Infecção por COVID-19	38	31,9	14	29,1		11	21,5		13	65	
Pneumonia bac- teriana	18	15,1	7	14,5		9	17,6		2	10	
Prematuridade	4	3,3	2	4,5		2	3,9		0	0	
Tumor cerebral	2	2,1	0	0		2	3,9		0	0	
<b>Total</b>	<b>119</b>	<b>100</b>	<b>48</b>	<b>100</b>		<b>51</b>	<b>100</b>		<b>20</b>	<b>100</b>	

\* Acidente Vascular Cerebral

\*\* Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

\*\*\* Doença Renal Aguda

\*\*\*\*Gastroenterocolite aguda

Fonte: Dados analisados através do software SPSS v20.0, (2022).

Na Tabela 5 verificamos que entre os diagnósticos de admissão hospitalar, a infecção por COVID-19 foi prevalente (n=38; 31,9%), seguida por pneumonia bacteriana (n= 18; 15,1%) e gastroenterocolite aguda (GECA) (n= 16; 13,4%). Em relação aos microrganismos identificados, houve um menor número de pacientes diagnosticados com COVID-19 que apresentaram coinfeção por *P. aeruginosa* (n=11; 28,9%), da maioria

foi isolado *A. baumannii* (n=14; 36,8%) ou *S. maltophilia* (n=13; 34,2%). Por outro lado, metade dos pacientes internados com diagnóstico de pneumonia bacteriana tiveram infecção por *P. aeruginosa* (n=9; 50%). Entretanto, não houve uma relação estatisticamente significativa entre o diagnóstico de admissão dos pacientes no HRN com o isolamento dos BGN-NF.

No período do estudo, ainda estávamos vivenciando o auge da pandemia de COVID-19, dessa forma observou-se que muitos pacientes internados foram admitidos com a forma moderada ou grave da doença. Com isso, foram submetidos a longos períodos de internação, consecutivamente aumentando a probabilidade de colonização bacteriana hospitalar e o risco para desenvolvimento de infecção relacionada à assistência à saúde.

Segundo Abreu e Silva *et al.*, (2021), para verificarmos uma coinfeção ou infecções consecutivas é necessário a apropriada identificação do agente infeccioso por meio de testes laboratoriais. Ademais, a adequada identificação dos microrganismos e do perfil de sensibilidade, tornam-se essenciais para o tratamento adequado.

Segundo Chen *et al.*, (2020) em pacientes com COVID-19, a coinfeção primária ou pneumonia bacteriana secundária foi responsável por 11% a 35% dos distúrbios relacionados à doença, além da patogênese do vírus. A coinfeção bacteriana desempenha um papel importante na complicação do diagnóstico, tratamento e prognóstico da COVID-19 e até mesmo no aumento da mortalidade (CHEN *et al.*, 2020).

Nossos dados estão em conformidade com os achados de Rawson *et al.*, (2020) que relatam que entre os patógenos mais encontrados em pacientes com diagnóstico de COVID-19 com coinfeção bacteriana estão *P. aeruginosa* e *A. baumannii*, além de outros microrganismos da família *Enterobacteriaceae*.

**Tabela 6** – Setor hospitalar do isolamento de BGN-NF em pacientes com IRAS no HRN

Setor	Total		<i>A. baumannii</i>		<i>P-valor</i>	<i>P. aeruginosa</i>		<i>P-valor</i>	<i>S. maltophilia</i>		<i>P-valor</i>
	n	%	n	%		n	%		n	%	
Clínica Cirúrgica	15	12,6	7	14,5	0,113	5	9,8	0,401	3	15	0,329
Clínica Médica	3	2,5	2	4,1		1	1,9		0	0	
UTI Adulto Clí- nico	20	16,8	8	16,6		9	17,6		3	15	
UTI Neo	11	9,2	4	8,3		5	9,8		2	10	
UTI Covid	18	15,1	7	14,5		9	17,6		2	10	

Observação Intermediária I	33	27,9	14	29,8	15	29,7	4	20
Unidade de Cuidados Especiais	9	7,5	2	4,1	4	7,8	3	15
Clínica pediátrica	5	4,2	1	2	2	3,9	2	10
Hospital campanha	3	2,5	2	4,1	1	1,9	0	0
UCI Neo	2	1,7	1	2	0	0	1	5
<b>Total</b>	<b>119</b>	<b>100</b>	<b>48</b>	<b>100</b>	<b>51</b>	<b>100</b>	<b>20</b>	<b>100</b>

Fonte: Dados analisados através do software SPSS v20.0, (2022).

Dos setores de identificação dos isolados foi observado que na Observação Intermediária I (OIA I) foi o ambiente hospitalar com maior isolamento de BGN-NF (n=33, 27,9%). Vale ressaltar, que esse setor no momento da coleta desta pesquisa era considerado unidade de internação por COVID-19, provavelmente esse fato explica a maior frequência de infecções por esses bacilos nesse setor específico, seguido pelos setores de UTI adulto clínico e UTI adulto COVID-19, com 20 (16,8%) e 18 (15,1%), respectivamente (Tabela 6).

Na (tabela 6) observamos também que entre os BGN-NF, *P. aeruginosa* e *A. baumannii*, foram os microrganismos mais frequentemente isolados entre os pacientes internados na OIA I com uma prevalência de 45,4% e 42,4%, respectivamente.

Harding *et al.* (2018) afirmam que pacientes internados em UTI colonizados por microrganismo multirresistente têm 24,4% mais chance de virem a óbito durante a hospitalização do que pacientes não colonizados por esses microrganismos. Além disso, pacientes infectados por microrganismo multirresistente têm complicações, como infecção do trato respiratório que desencadeia dispneia intensa e angina; pode também ocorrer infecções na corrente sanguínea provocando infecção primária de corrente sanguínea, resultando em sepse generalizada, hipotensão grave, podendo ter como consequência final o óbito (MELO *et al.*, 2021).

Pacientes que necessitam de unidades de terapia intensiva podem ser infectados durante a hospitalização. Fatores intrínsecos e extrínsecos são preditores de suscetibilidade ao desenvolvimento de IRAS, como imunodeficiência, idade avançada, diabetes, tabagismo, estado nutricional e tempo de internação, características comumente observadas em unidades de terapia intensiva (CARIOCA, 2019).

**Tabela 7** – Sítio do isolamento de BGN-NF em pacientes com IRAS no HRN

Material	Total		A. <i>baumanni</i>		P- valor	P. <i>aeruginosa</i>		P- valor	S. mal- <i>tophilia</i>		P- valor
	n	%	n	%		n	%		n	%	
Sangue	25	21	12	25	0,368	10	19,6	0,670	3	15	0,539
Fragmento Tecido	16	13,4	6	12,5		8	15,6		2	10	
Urina	16	13,4	0	0		5	9,8		11	55	
Aspirado Traqueal	50	42,0	26	54,1		22	43,1		2	10	
LBA*	8	6,7	3	6,2		4	7,8		1	5	
Ponta cateter	4	3,5	1	2,2		2	4,1		1	5	
<b>Total</b>	<b>119</b>	<b>100</b>	<b>48</b>	<b>100</b>		<b>51</b>	<b>100</b>		<b>20</b>	<b>100</b>	

\*Lavado brônquico-alveolar

Fonte: Dados analisados através do software SPSS v20.0, (2022).

Conforme visto na (Tabela 7), em pacientes com IRAS hospitalizados no HRN, os sítios com maior frequência de isolamento de BGN-NF foram aspirado traqueal (42%) e sangue (21%). Sendo que *A. baumannii* foi isolado da maioria das amostras de aspirado traqueal (52%) e teve a maior frequência nas amostras de sangue (48%).

Adicionalmente, o sítio com maior isolamento de *P. aeruginosa* foi aspirado traqueal (n=22; 44%) e de *S. maltophilia* foi a urina (n=11; 68,7%) (Tabela 7).

As infecções do trato respiratório (IRT) causadas por microrganismos não fermentadores, como *A. baumannii* e *P. aeruginosa* estão entre as principais IRAS nas unidades hospitalares, e tendem a levar a uma alta morbidade e mortalidade. Estes patógenos exibem múltiplos mecanismos de resistência aos antibióticos. Ceftolozane-tazobactam (C/T) é um fármaco com um agente inibidor de beta-lactamase que pode ser considerado uma opção clínica para pneumonia hospitalar em pacientes graves principalmente pelo risco aumentado de isolados resistentes a meropenem e piperacilina-tazobactam (SANTOS, 2022).

Os microrganismos multirresistentes vem assumindo importante papel nos processos infecciosos, e inúmeros são os relatos de surtos de infecção hospitalar em todo o mundo. No nosso estudo, observa-se que a maioria dos casos de isolamento de BGN-NF foram a partir de cultura de trato respiratório. Esses resultados corroboram com os achados do *Center for Disease Control* (CDC), de que microrganismos como *P. aeruginosa* e *A. baumannii* estão entre os patógenos mais comuns nas unidades críticas e são encontrados principalmente nas secreções traqueais, com perfil de multidroga resistência (ROCHA *et al.*, 2017).

**Tabela 8** – Genes de resistência detectados em BGN-NF isolados de pacientes com IRAS no HRN

Microorganismo	Total	<i>blaKPC 2</i>		p-	<i>blaOXA-143</i>		p-	<i>mcr-1</i>		p-
		Presente	Ausente	Valor	Presente	Ausente	Valor	Presente	Ausente	Valor
<i>A. baumannii</i>	<b>20</b>	12	8	0,496	12	8	0,437	3	17	0,205
	<b>(100%)</b>	(60%)	(40%)		(60%)	(40%)		(15%)	(85%)	
<i>P. aeruginosa</i>	<b>20</b>	9	11		9	11		3	17	
	<b>(100%)</b>	(45%)	(55%)		(45%)	(55%)		(15%)	(85%)	
<i>S. maltophilia</i>	<b>19</b>	9	10		10	9		0	19	
	<b>(100%)</b>	(47,3%)	(52,7%)		(52,7%)	(47,3%)		(0,0%)	(100%)	

Fonte: Dados analisados através do software SPSS v20.0, (2022).

Em relação ao estudo genômico, nem todos os isolados estavam viáveis. Portanto, só foi possível realizar a análise de 59 (49,5%). Desse total, 20 (33,9%) eram *A. baumannii*, 20 (33,9%) *P. aeruginosa* e 19 (32,2%) *S. maltophilia*. Os três genes analisados foram detectados em isolados de *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, enquanto o gene *mcr-1* não foi encontrado em nenhum isolado de *S. maltophilia* (Tabela 8).

Adicionalmente, em 4 (20%) isolados de *P. aeruginosa*, em 6 (30%) de *A. baumannii* e em 7 (36,8%) de *S. maltophilia* foram identificados simultaneamente os genes *bla-KPC2* e *bla-oxa143*. Além disso, 2 (10%) espécimes de *A. baumannii* albergavam os três genes do estudo de forma simultânea.

Dessa forma, este estudo demonstrou uma maior prevalência dos genes *bla-KPC2* e *bla-oxa143* em isolados de *A. baumannii* quando comparado aos demais microrganismos analisados. Sendo que 60% dos espécimes de *A. baumannii* albergavam esses genes e apenas 15% tinham o gene *mcr-1*. Nos isolados de *P. aeruginosa* também foram detectados esses genes embora em menor proporção. Todavia, não houve correlação estatisticamente significativa entre a detecção dos genes estudados e os BGN-NF identificados, possivelmente isso pode ser elucidado pelo pequeno número de isolados analisados.

O surgimento do *bla-KPC2* tornou-se uma ameaça mundialmente estabelecida à saúde, além de apresentar um grande desafio para o tratamento de infecções nosocomiais. Esse gene já foi descrito em isolados de *Klebsiella* spp. (TUMBARELLO *et al.*, 2012), *Pseudomonas* spp. (POIREL *et al.*, 2010), *Enterobacter* spp. (NAAS *et al.*, 2011), *Acinetobacter* spp. (ROBBLEDO, 2010).

Estudos realizados na China, demonstraram isolados de *P. aeruginosa* produtores de carbapenemase expressando o gene KPC que parecem estar se disseminando por todo



o mundo. A presença de *bla*-KPC2 em isolados de *P. aeruginosa* é preocupante em uma espécie sabidamente propensa a se tornar resistente a carbapenêmicos por múltiplos mecanismos (GE *et al.*, 2011). Além disso algumas análises realizadas na América do Sul de isolados de *A. baumannii* produtores de *bla*-KPC2 de diferentes hospitais também demonstraram um potencial de disseminação mundial (CUZON *et al.*, 2011).

Um estudo realizado no norte da China por YANG, *et al.*, (2016), verificou a prevalência e o destino de genes de carbapenemases em uma estação de tratamento de águas residuais, tendo identificado através do sequenciamento de genes e suas similaridades, clones de resistência, dentre eles foi identificado a presença do gene *bla*-KPC2 em isolados de *S. maltophilia*. Na amostra dessa pesquisa, 47,3% dos isolados dessa bactéria apresentavam o gene *bla*-KPC2.

No que diz respeito ao gene *bla*-*oxa*143, GIRIJA *et al.*, (2019) relatam a expressão de carbapenemases e oxacilinase que são mundialmente reconhecidas como principais mecanismos responsáveis pela resistência hidrolisante de carbapenêmicos (CHDL). Segundo ROMANIN *et al.*, (2019), esse gene foi identificado primeiramente no Brasil, com similaridade de 88% com o *bla*-*oxa*40.

Um estudo realizado nos hospitais da Universidade de Zagani no Egito Verificou caracterização dos genes de resistência a carbapenêmicos em *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, demonstrando que o gene *bla*-*oxa*143 foi identificado em 50% dos isolados de *A. baumannii* enquanto esteve ausente em *P. aeruginosa* (RAMADAN, 2018). Diferente dos resultados encontrados nesse estudo, nos quais 45% dos isolados de *P. aeruginosa* albergavam esse gene. Embora, Sevillano *et al.*, (2009), tenham identificado o gene *bla*-*oxa*40 em isolados clínicos de *P. aeruginosa* resistentes a imipenem na Espanha, além disso reforçam a similaridade do gene *bla*-*oxa*40 com *bla*-*oxa*143.

Em relação a *S. maltophilia* existem opções terapêuticas limitadas para infecção causada por esse microrganismo, pois este costuma apresentar resistência à maioria dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, inclusive carbapenêmicos, além de macrolídeos e aminoglicosídeos (WANG, 2016). Nesta pesquisa, na maioria dos espécimes dessa bactéria foi detectado o gene *bla*-*oxa*143. Durante a pesquisa não foram encontradas outras investigações científicas publicadas sobre a ocorrência de *bla*-*oxa*143 em isolados de *S. maltophilia*.

A colistina é uma das últimas opções de escolha para tratamento de infecções por patógenos Gram-negativos multirresistentes nas unidades hospitalares. *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *A. baumannii*, estão entre eles. Um estudo realizado na China

descreve que o gene *mcr-1* de resistência à colistina foi inicialmente identificado em um plasmídeo IncI2 de 64,1 kb denominado pHNSHP45 (LIU, 2016).

Investigações subsequentes revelaram que há uma disseminação mundial do gene *mcr-1* (HASMAN, 2015). Um estudo realizado na Dinamarca verificou transferência de resistência à colistina através de plasmídeos de clones com padrão de resistência portadores do gene *mcr-1* (ou seja, que têm plasmídeo que medeia resistência à colistina) para *P. aeruginosa* (LIU *et al.*, 2016). Foi detectado em 15% dos isolados de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* o gene *mcr-1*, comprovando essa disseminação mundial. Mais recentemente, genes *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* e *mcr-5* que medeiam resistência à colistina também foram relatados (BOROWIAK, *et al.*, 2017).

As infecções por *S. maltophilia* comumente são difíceis de tratar devido ao padrão de multidroga resistência desse microrganismo, embora eles sejam frequentemente suscetíveis a fluoroquinolonas e polimixinas. E de fato, nesta pesquisa não detectamos o gene *mcr-1* em espécimes dessa bactéria. Entretanto, um estudo chinês com esse patógeno isolado de infecções de trato respiratório demonstrou altos padrões de resistência à maioria dos antimicrobianos, incluindo fluoroquinolonas e polimixinas, além de resistência por mecanismos moleculares causados por plasmídeo contendo o gene *mcr-1* (HE *et al.*, 2015).

**Tabela 9** – Perfil de sensibilidade antimicrobiana de BGN-NF isolados de pacientes com IRAS no HRN seguindo recomendações do BrCAST

Antibióticos	A. <i>baumannii</i> n=48		P – valor	P. <i>aeruginosa</i> n=51		P – valor	S. <i>maltophilia</i> n=20		P- valor
	R	S		R	S		R	S	
Amicacina	83%	17%	0,316	93%	7%	0,863	-	-	
Gentamicina	-	-		100%	-	<b>0,046</b>	-	-	
Ceftolozane/Tazobactam	-	-		70%	30%	0,819	-	-	
Ceftazidima	-	-		100%	-	0,436	-	-	
Cefepime	-	-		100%	-	0,749	-	-	
Pipe-Tazo*	100%	0%	0,775	100%	0%	<b>0,036</b>	-	-	
Imipenem	100%	0%	0,736	80%	20%	0,525	-	-	
Meropenem	100%	0%	0,867	90%	10%	0,348	-	-	
Aztreonam	4%	96%	0,526	-	100%	0,921	-	-	
Colistina	96%	4%	0,378	70%	30%	0,648	-	-	
Levofloxacina	65%	35%	0,669	-	-		90%	10%	0,094
Tigeciclina	100%	0%	0,658	100%	0%	0,527	-	-	
Ertapenem	58%	42%	0,532	-	100%	0,443	-	-	

Tobramicina	88%	13%	0,520	-	-	-	-	-	
Trimetoprima/Sulfametazol	44%	56%	0,699	100%	-	0,863	70%	30%	0,139

\*Piperacilina+tazobactan

Fonte: Dados analisados através do software SPSS v20.0 (2022).

A (tabela 9) demonstra que todos os isolados de *A. baumannii* testados foram resistentes aos carbapenêmicos (Imipenem e Meropenem) à Tigeciclina e à Piperacilina+tazobactan, e a maioria foi resistente à Colistina (96%), à Tobramicina (88%) e à Amicacina (83%).

Por outro lado, todos os isolados de *P. aeruginosa* apresentaram resistência à Gentamicina, Ceftazidima, Cefepime, Piperacilina+tazobactan, Tigeciclina e à Trimetoprima/Sulfametazol, mas foram sensíveis ao Aztreonam e ao Ertapenem. Adicionalmente, a maioria foi resistente aos demais antimicrobianos testados e esses dados foram estatisticamente significantes em relação à Gentamicina ( $p = 0,046$ ) e à Piperacilina+tazobactan ( $p = 0,036$ ), ou seja, *P. aeruginosa* apresentou a mais alta taxa de resistência em relação aos antibióticos testados do que os demais BGN-NF isolados de IRAS no HRN (Tabela 9).

Vale ressaltar ainda, que a maioria dos espécimes de *S. maltophilia* apresentaram sensibilidade à Levofloxacina (90%) e à Trimetoprima/Sulfametazol (70%) (Tabela 9).

**Tabela 10**– Correlação da presença dos genes *mcr-1* e *bla*<sub>kpc-2</sub> em BGN-NF com resistência à colistina e a carbapenêmicos

Gene	<i>microrganismos</i>				
	<i>A baumannii</i> <i>n=3</i>	<i>P-valor</i>	<i>P. aeruginosa</i> <i>n=9</i>		<i>P-valor</i>
<i>mcr-1</i>	Colistina 2 (66,6%)	0,808	-		<b>0,041</b>
<i>bla</i> <sub>kpc-2</sub>	-		Meropenem 9 (100%)	Imipenem 9 (100%)	Ertapenem 3 (33,3%)

Fonte: Dados analisados através do software SPSS v20.0 (2022).

Importantemente, os dados dessa pesquisa revelaram que 66,6% dos isolados de *A. baumannii* que apresentavam o gene *mcr-1* eram resistentes à colistina. E que todos os espécimes de *P. aeruginosa* que albergavam o gene *bla*<sub>kpc-2</sub> eram resistentes ao meropenem e imipenem, e 33,3% resistentes ao ertapenem, dados estes estatisticamente significantes ( $p = 0,041$ ), conforme descrito na (tabela 10).

Os aminoglicosídeos, muitas vezes em combinação com beta-lactâmicos de largo espectro, têm sido utilizados para tratar infecções bacterianas por Gram-negativos. Os carbapenêmicos e fluoroquinolonas isoladamente não estão sendo suficiente para o tratamento de pacientes com esses microrganismos, devido à enzima modificadora acetiltransferase, que está diretamente envolvida na resistência antimicrobiana desses bacilos, por apresentarem resistência intrínseca aos aminoglicosídeos. Ainda assim, tem sido visto o uso de amoxicilina e ácido clavulânico para tratamento de infecções por essas bactérias, devido a crescente taxa de resistência aos aminoglicosídeos que é atribuída ao uso exacerbado desses fármacos na terapia de infecções nosocomiais por *A. baumannii* multidroga resistente (QUARESMA *et al.*, 2016).

*P. aeruginosa* vem se destacando cada vez mais em relação ao aumento das taxas de resistência no ambiente hospitalar, principalmente quando se retrata as UTIs. Nossa pesquisa corrobora com esses dados, uma vez que observamos resistência desse microrganismo à maioria dos antimicrobianos analisados, mas ainda com a possibilidade do uso terapêutico de Aztreonam e Ertapenem para tratar IRAS por esse patógeno.

Os dados apresentados nessa pesquisa, reforçam os achados de LEMOS *et al.* (2021) que realizaram um estudo no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco e evidenciaram taxa de resistência de *P. aeruginosa* ao Imipenem de 81,8% e ao Meropenem de 79,3%, em relação a este último antimicrobiano a taxa observada nos nossos isolados foi maior (90%). Outro dado preocupante, é que no mesmo estudo, a taxa de resistência à Colistina foi de 40%, bem menor do que a observada nesta pesquisa (70%) (LEMOS *et al.* 2021).

Silva (2018) nos alerta que o tratamento de IRAS por *S.maltophilia* não pode ser feito de forma imprudente, devido aos altos níveis de resistência desse microrganismo, a facilidade de gerar multirresistência e à alta taxa de mortalidade, relatando 95% de resistência à Levofloxacina, semelhantes aos dados encontrados nesse estudo com resultados (90%) e apenas 43% à Trimetoprima/Sulfametazol, dado este bem menor do que o observado no nosso estudo. Além disso, nossos dados demonstraram que essa bactéria estava relacionada com maior prevalência de óbito (Tabela 11).

**Tabela 11**– Desfecho clínico dos pacientes com IRAS por BGN-NF no HRN

	<i>Total</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. maltophilia</i>	
<b>Óbito</b>		<i>P – valor</i>	<i>P- valor</i>	<i>P- valor</i>	
Não	<b>49</b> <b>(41,1%)</b>	20 (41,6%)	0,712	25 (49%) 0,573	4 (20%) 0,903
Sim	<b>70</b> <b>(58,9%)</b>	28 (58,4%)		26 (51%)	16 (80%)
Total	<b>119</b> <b>(100%)</b>	48 (40,3%)		51 (42,8%)	20 (16,8%)

Fonte: Dados analisados através do software SPSS v20.0 (2022).

Neste estudo, 70 (58,9%) dos pacientes com IRAS foram a óbito. Ao fazermos a correlação da infecção com o microrganismo isolado percebemos uma alta taxa de mortalidade para todos as IRAS pelos BGN-NF. Porém, observamos que 80% dos pacientes infectados com *S. maltophilia*, foram a óbito, apresentando o pior desfecho clínico, evidenciando um elevado grau de virulência desse microrganismo (Tabela 11).

As IRAS causadas por *A. baumannii* e *P. aeruginosa* especialmente, em pacientes internados nos ambientes hospitalares, têm sido associadas a altos índices de gravidade e mortalidade, podendo chegar a 70% após sua identificação, essa condição irá depender do período de internação, diagnóstico de admissão e dispositivos invasivos que o paciente usa (ELLIOTT *et al.*, 2020).

Em relação à *S. maltophilia*, o microrganismo vem se destacando na última década como causador de IRAS, atuando principalmente em indivíduos imunocompetentes, associado a uma alta morbidade e mortalidade sendo que em muitas unidades hospitalares é considerada o terceiro gram-negativo não fermentador de maior importância, perdendo apenas para *P. aeruginosa* e *A. baumannii* (ESPOSITO *et al.*, 2017).

Esse estudo apresenta limitações, uma vez que permite considerar o quantitativo dos isolados, entretanto, os resultados obtidos nesta pesquisa podem ser úteis como dados epidemiológicos, e destacam-se a necessidade de estudos futuros com a realização de métodos que possam melhorar esses resultados e prevenir a disseminação desses isolados.

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo nos permitem concluir que *P. aeruginosa* foi o BGN-NF mais frequentemente isolado de IRAS no HRN; que os pacientes mais afetados eram do gênero masculino na faixa etária de 61-80 anos. Além disso, entre os diagnósticos de admissão hospitalar, a infecção por COVID-19 foi prevalente e o setor hospitalar onde houve o maior isolamento de BGN-NF foi na Observação Intermediária I, ambiente este que na época da pesquisa ficavam internados pacientes adultos com COVID-19. O sítio com maior frequência de isolamento de BGN-NF foi aspirado traqueal, onde também foi observada uma maior prevalência de *P. aeruginosa* isolada deste sítio.

Em relação ao estudo genômico, observou-se uma maior prevalência dos genes *bla*<sub>-KPC2</sub> e *bla*<sub>-oxa143</sub> em isolados de *A. baumannii* quando comparado a *P. aeruginosa* e *S. maltophilia*. Quanto à resistência antimicrobiana, *P. aeruginosa* apresentou um perfil MDR, além da mais alta taxa de resistência aos antimicrobianos testados, e por fim os pacientes infectados com *S. maltophilia* apresentaram o pior desfecho clínico, apresentando a mais alta taxa de mortalidade.

Dessa forma, ressalta-se a importância de se conhecer a epidemiologia local para que, a partir dela, seja possível trabalhar de forma integrada com o Serviço de Controle de Infecção Hospitalar para a elaboração de orientações adequadas e regimes terapêuticos direcionados, visando diminuir a frequência de IRAS e obter um melhor prognóstico para os pacientes.

## REFERÊNCIAS

- ABBO A, N. *et al.* Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. **Emerg Infect Dis.** 2015;11(1):22-29.
- ABREU, J. A. C. SILVA, F. B. A. Uma “espada-de-dois-gumes”: bactérias & Covid19. **J. Brazilian of Develop**, Curitiba, v.7, n.5, p. 53750-53769 may. 2021. DOI: 10.34117/bjdv7n5-670. Disponível em: <https://www.brazilianjournals.com/index>. Acesso em: 20 Set. 22.
- ADEGOKE, A. A, STENSTROM, T.A.; OKOH, A. *Stenotrophomonas maltophilia* as an emerging ubiquitous pathogen: Looking beyond contemporary antibiotic therapy. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. NOV, p. 1–18, 2017.
- AKINYEMI, K.O. *et al.* Occurrence of extended-spectrum and AmpC  $\beta$ -lactamases in multiple drug resistant *Salmonella* isolates from clinical samples in Lagos, Nigeria. **Infect. and Drug Resist.**, London, v. 10, p. 19-25, Jan. 2017. ISSN: 1178-6973.
- ANDRADE, L. N. **Genética e epidemiologia molecular de enterobactérias produtoras de KPC no Brasil.** 2011. 68 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.
- ANGLES, E. Uso racional de antimicrobianos e resistência bacteriana: para onde vamos? **Rev. Med. Hered**, v. 29, n.1 pág.3-4 de janeiro de 2018.
- ARAQUE, M.; LABRADOR, I. **Prevalence of Fecal Carriage of CTX-M-15 Beta-Lactamase Producing *Escherichia coli* in Healthy Children from a Rural Andean Village in Venezuela.** *Osong Public Health Research Perspectives*, v.9, n.1, p.9-15, 2018.
- ARRUDA, C. J. M. *et al.* Revisão Bibliográfica de Antibióticos Beta-Lactâmicos. **Rev. Saúde em Foco** – Edição nº 11. Centro Universitário Max Planck. Indaiatuba, SP, 2019.
- AUSUBEL, F.M, *et al.* **protocols in Molecular Biology: a compendium of methods from current protocols in molecular biology.** Wiley. 5th e 2002.
- BADWAL, J. T. *et al.* Terapia padrão versus alternativa para infecções por *Stenotrophomonas maltophilia*: foco na monoterapia com trimetoprim-sulfametoxazol, minociclina e moxifloxacina. 2018. **Diag. Infect Dist**5:S723.doi: 10.1093/ofid/ofy210.2072.
- BAE, I. K. *et al.* Genetic and biochemical characterization of GES-5, an extended-spectrum class A beta-lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. **Diag. Infect. Dist** 2007;58(4):465-8.
- BIRNBOIM, H.C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 1979 Nov 24;7(6):1513-23. doi: 10.1093/nar/7.6.1513. PMID: 388356; PMCID: PMC342324.



BOROWIAK, M. *et al.* Identificação de um novo gene da fosfoetanolamina transferase associado ao transposon, *mcr-5*, que confere resistência à colistina em salmonela enterica subsp. fermentadora de d-tartarato. enterica sorovar Paratyphi B. **J. Antimicrob Chemother.** 2017;12:3317-3324

BRADFORD, P. A. Beta-lactamases de espectro estendido no século 21: caracterização, epidemiologia e detecção desta importante ameaça de resistência. **Clin. Microbiol** 2001; 14 (4): 933–51.

BRAGA, J. M.; **Prevalência e sensibilidade antimicrobiana de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* isoladas de infecções nosocomiais no hospital regional norte em sobral/ce e detecção genética de *blatem*, *blashv* *blactx-m* e *blages* em espécimes produtores de betalactamase de espectro estendido (esbl).** 2016. 101f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – *Campus* de Sobral, Universidade Federal do Ceará, Sobral, 2016.

BRASIL, Anvisa. **Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde n° 20:** Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência microbiana do ano de 2018.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Programa nacional de prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde (2018-2020).** 2. ed. Brasília: ANVISA, 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Investigação e controle de bactérias multirresistentes. Brasília: Ministério da Saúde; 2017, SESA, Assessoria de Comunicação da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará. Governador inaugura dia 18 o maior hospital do interior do Ceará. 2013. Disponível em: <http://www.lacen.ce.gov.br/index.php/noticias/43509-governador-inaugura-dia-18-o-maior-hospital-do-interior-do-ceara->

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BR). **Segurança do paciente: higienização das mãos. Brasília (DF);** 2009 [citado 2018 jul 15]. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/seguranca\\_paciente\\_servicos\\_saude\\_higienizacao\\_maos.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/seguranca_paciente_servicos_saude_higienizacao_maos.pdf)

BRITO, I. L. P.; **Diversidade genômica de isolados nosocomiais de *actinetobacter baumannii* multirresistentes produtores de carbapenemases em hospitais de ensino do Ceará.** 2018. 97 F. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará, Sobral, 2018.

BRITO, I. L. P. *et al.* High Frequency of OXA-Type Carbapenemases Among Acinetobacter 2 baumannii Strains in Teaching Hospitals of Ceará, Brazil. **J. of Microbiology.** 2018.

CARIOCA, G. **Perfil epidemiológico de infecções relacionadas à assistência à saúde na UTI geral de um hospital filantrópico brasileiro.** Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) – 2019. Faculdade Guairacá, [htt://200.150.122.211:8080/jspui/handle/23102004/131](http://200.150.122.211:8080/jspui/handle/23102004/131).



CHARAN, J. *et al.* New Delhi Metallo-beta lactamase-1 containing enterobacteriaceae: origin, diagnosis, treatment and public health concern. **J. Pan. Afr. Med** 2012; 11:22.

CHEN, X. *et al.* **The microbial coinfection in COVID-19.** Applied microbiology and biotechnology, 104(18), 7777–7785. 2020.

CHOI, C.H. *et al.* Outer membrane protein 38 of *Acinetobacterbaumannii* localizes to the mitochondria and inducesapoptosis of epithelial cells. **Rev. Cell Microbi.** 2015;7(8):1127-38.

CORZO-DELGADO, J. E. *et al.* *Stenotrophomonas maltophilia*, an increasingly important nosocomial pathogen. **Enf. Infect Microbiol Clin**, v. 24, p. 1-3, 2006.

DJAHMI, N, *et al.* Epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and *Acinetobacter baumannii* in Mediterranean countries. **Bio. Med Research International**, v. 2014.

DRISCOLL, J. A. *et al.* - **The epidemiology, pathogenesis and treatment of Pseudomonas aeruginosa infections.** Drugs. 67(3) (2007) 351–368

ECKBURG, P.B. *et al.* Um potencializador intravenoso, após doses únicas e múltiplas ascendentes e quando combinado com antibióticos  $\beta$ -lactâmicos em indivíduos saudáveis. **A. Agents Chemother.** Setembro de 2019; 63

EHRENTAUT C. *et al.* Detecção de infecções adquiridas em hospitais: uma abordagem de classificação de documentos usando máquinas de vetores de suporte e aprimoramento da árvore de gradiente. **Rev. de Informatic em Saúde.** Vol 24, Issue 1, pp. 24 - 42, 2018.

EINARSSON, G. G. *et al.* Community analysis and co-occurrence patterns in airway microbial communities during health and disease. **E. Open Research**, [s.l.], v. 5, n. 3, p.00128-2017, jul. 2019. European Respiratory Society (ERS).

ELABBADI, A. *et al.* An unusual community-acquired invasive and multi systemic infection due to ExoU-harboring *Pseudomonas aeruginosa* strain: Clinical disease and microbiological characteristics. **J. of Microbiol, Immunology and Infec** [s.l.], p.1-5, jul. 2019.

ELLIOTT, J. A. *et al.* Nosocomial SARS-CoV-2 transmission in postoperative infection and mortality: analysis of 14 798 procedures. **The British J. of surgery**, v. 107, n. 13, p. 1708, 2020.

ESPOSITO A. B. L. *et al.* Evolução de *Stenotrophomonas maltophilia* em pulmão de fibrose cística sobre infecção crônica: um estudo genômico e fenotípico populacional. **Rev. Frente. Microbiol.** 2017. 8:1590.10.3389/fmicb.2017.01590.

FANDINO-MENDEZ, Y.R. *et al.* **Caracterización clínica de infecciones de vías urinarias producidas por enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido em Duitama** (Colombia), durante 2010-2015. Bogotá, v.21, n.1, p.15-18, 2017.

FERRAREZE, M. V. G. et al. *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente em unidade de cuidados intensivos: desafios que procedem? **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 20, n. 1, p. 7–11, 2007.

FERNANDO, M. M. P. S. C. et al. Organismos produtores de beta lactamase de espectro estendido que causam infecções do trato urinário no Sri Lanka e seu padrão de suscetibilidade a antibióticos – um estudo transversal baseado em hospital. **Clin. Infect. Dis** 17,138 (2017) .

FOURNIER, P.E. et al. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. **Clin. Infect. Dis**. 2016; 42(5):692-9.

GE C. W. Z. Identification of KPC-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in China. **Jor. Antimicrob Chemother**. 2011 May;66(5):1184-6. doi: 10.1093/jac/dkr060. Epub 2011 Mar 3. PMID: 21393139.

GEORGE, M. et al. *Acinetobacter baumannii*: epidemiologia, Resistência Antimicrobiana e Opções de Tratamento, **Rev. Doenças Infecciosas Clínicas**, Volume 46, Edição 8, 15 de abril de 2008, Páginas 1254–1263.

GESSARD, C. On the Blue and Green Coloration that Appears on Bandages. **Clinical Infectious Diseases**, [s.l.], v. 6, n. 3, p.775-776, 1 set. 1984. Oxford University Press (OUP). [http://dx.doi.org/10.1093/clinids/6.supplement\\_3.s775](http://dx.doi.org/10.1093/clinids/6.supplement_3.s775). Disponível em: <[https://academic.oup.com/cid/article-abstract/6/Supplement\\_3/S775/296011?redirectedFrom=fulltext](https://academic.oup.com/cid/article-abstract/6/Supplement_3/S775/296011?redirectedFrom=fulltext)>. Acesso em: 06 set. 2019.

GIRIJA, S.A. et al. A. Prevalence of carbapenemhydrolyzing OXA-type  $\beta$ -lactamases among *Acinetobacter baumannii* in patients with severe urinary tract infection. **Acta. Microbiologica et Immunologica Hungarica**, p. 1-7, 2019.

GOMES, M.F.; MOARES, V.L.; [The infection control program regarding health care in hospital environments and the duty of surveillance of the Brazilian Health Regulatory Agency]. **Rev. Dir. Sanit**. 2018;18(3):43-61. Portuguese. doi: <https://doi.org/10.11606/issn.2316-9044.v18i3p43-61>

HARDING, C. M. et al. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. **Nat. Rev. Microbiol**, v. 16, n. 2, p. 91-102, 2018.

HASMAN, H. et al. **Detecção de isolados de Escherichia Coli resistentes à colistina mediados por plasmídeo codificadores de mcr-1 de infecção da corrente sanguínea humana e carne de frango importada**. Dinamarca 2015.

HE, T. J. et al. Caracterização de uma ilha genômica em *Stenotrophomonas maltophilia* que carrega uma nova variante do gene *floR* . **J. Antimicrob Chemother**, 2015: 70 - 1031–1036.

HIGGINGS, P. G. Inclusion of OXA-143 oligonucleotídeos in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. **Inter. J. of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 35, p. 305-314, Mar. 2010

HOWARD, A. M. et al. *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen. **Virulence**. 2012; 3(3):243-50.

HUANG, Y. et al. Acinetobacter baumannii ventilator-associated pneumonia: Clinical efficacy of combined antimicrobial therapy and in vitro drug sensitivity test results. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, n. FEB, p. 1–11, 2019.

JEON, Y.D. et al. **Fatores de risco para mortalidade em pacientes com bacteremia de *Stenotrophomonas maltophilia***. 2016 – 95: e4375. 10.1097/MD.0000000000004375

KAITANY, K.C. et al. Structures of the class D Carbapenemases OXA-23 and OXA-146: mechanistic basis of activity against carbapenems, extended-spectrum cephalosporins, and aztreonam. **Antimicrob. Agents Chemother.** 2013;57(10):4848-55

LAHEY, B.L.  **$\beta$ -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes**. 2017 Disponível em: <<http://www.lahey.org/studies/>>

LEMOS, A.S. et al. Análise das infecções do trato respiratório em unidade de terapia intensiva de um hospital do sul do Brasil. **Rev. Society and Development** 2021.

LIMA, M. M. de S. et al. Detecção de Enterobacterales produtoras de carbapenemases em pacientes colonizados, atendidos em um Hospital Universitário. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, 13(2), e6222. <https://doi.org/10.25248/reas.e6222.2021>.

LINCOPAN, N.; TRABULSI, L. R. *Pseudomonas aeruginosa* In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia** 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. p. 369-81.

LIU, Y. et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **L. Infectious Diseases**, New York, v. 16, n. 2, p. 161-168, Nov. 2015.

LIU, Y.Y. et al. Emergência do mecanismo de resistência à colistina mediada por plasmídeo MCR-1 em animais e seres humanos na China: um estudo microbiológico e de biologia molecular. **L. Infect Dis.** 2016;16:161-168

LOPES, A.C.C. et al. Fatores de risco para infecção por *Pseudomonas aeruginosa* em relação às infecções hospitalares. **Braz. J. of Develop.**, Curitiba, v.6, n.1, p.2121-2130, 2020.

MACHADO, O. V. O. et al. **Antimicrobianos: revisão geral para graduandos e generalistas** [recurso eletrônico] / Olga Vale Oliveira Machado... [et al.]. – Fortaleza: EdUnichristus, 2019.

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.G. et al. Carbapenemases in Enterobacteriaceae: Types and molecular epidemiology. **Enfer. Infecciosas y Microbiol Clínica**, v. 32, p. 4-9, 2014.

MARTINS, S.G. *et al.* **Prevalência e Perfil de resistência de microrganismos isolados do trato respiratório inferior de pacientes internados no Hospital Divina Providência.** RBAC. 2008; 40(2):83- 6

MATOS, E.C.O. *et al.* Mortalidade em pacientes com infecções multirresistentes por *Pseudomonas aeruginosa* uma meta-análise. **Rev. Soc. Brasileira Med-Trop.** 2018a; 51 (4): 415–420.

MATOS, M. C. B. *et al.* Controle de infecção é sinal de segurança": discussões a partir da perspectiva discente. **Rev. P. cuidados e fundam.** (Online); 10(3): 640-646, jul.-set. 2018b.

MELO, C. C. *et al.* Infecção por *Acinetobacter baumannii* em unidades de terapia intensiva. **Rev. Multidisciplinar em Saúde**, [S. l.], v. 2, n. 4, p. 94, 2021. DOI: 10.51161/remis/2851. Disponível em: <https://editoraime.com.br/revistas/index.php/remis/article/view/2851>. Acesso em: 29 Mai. 2022.

MENDONÇA, D.L.*et al.* **Prevalência e perfil de sensibilidade dos microrganismos isolados em aspirado traqueal de pacientes com pneumonia associada à ventilação mecânica em unidade de terapia intensiva.** 2019. UFMG – C:/Users/Canto/Downloads/845-Corpo%20do%20Manuscrito-3668-2-10-20191217-1.pdf>.

MOELLERING, R.C. *et al.* The carbapenems: new broad spectrum-lactam antibiotics. **J. Antimicrob Chemother**, n.24, p.1-7, 2018.

NAAS T. C. *et al.* Quando carbapenem-hidrólise-lactamase KPC encontra *Escherichia coli* ST131 na França. Antimicrobiano. **Rev. A. Chemother.**2011;55(10): 4933–4934.pmid:21768511.

NEWTON, F. M. *et al.* A resistência à colistina *mcr-1* mediada por plasmídeo em *Escherichia coli* e *Klebsiella spp.* isolados clínicos da região de Western Cape da África do Sul. **Antim. Resist Infect Control** 6, 78 (2017).

NICOLETTI, A. G. **Caracterização genética e bioquímica da BKC-1, uma nova carbapenemase da classe A de Ambler, isolada de amostras clínicas de Klebsiella pneumoniae.** 2014. 145f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

NOGUEIRA, J.C. *et al.* **Characterization of epidemiological surveillance systems for healthcare-associated infections (HAI) in the world and challenges for Brazil.** Cad Saude Publica, v.30, n.1, p.11-20, 2014.

OLAITAN, A.O.; MORAND, S. R. Mecanismos de resistência à polimixina: resistência adquirida e intrínseca em bactérias. **Front. Microbiol.** 2014; 5 (643): 1–18.

PADOVEZE, M.C. *et al.* O conceito de vulnerabilidade aplicado às Infecções relacionadas à Assistência à Saúde. **Rev. Bras. enferm.vol.72 no.1 Brasília Jan./Feb.** Universidade de São Paulo, Escola de Enfermagem. São Paulo-SP, Brasil. 2019.

- PADOVEZE, M.C.; FORTALEZA, C.M.C.B. Healthcare-associated infections: challenges to public health in Brazil. **Rev. Saúde Pública**. 2014;48(6):995-1001. doi: <https://doi.org/10.1590/S0034-8910.2014048004825>.
- PELEG, A.Y; SEIFERT, H. PATERSON, D.L. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. **Rev. Clin. Microbiol** . 2008. 21(3): 538-582
- POIREL, L. *et al.* Emergência de *Pseudomonas aeruginosa* produtora de KPC nos Estados Unidos. **Age. Antimicrob. Chemother**. 2010; 54(7): 3072. pmid:20421402.
- POIREL, L., *et al.* Resistência antimicrobiana em *Escherichia coli*. Em Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion Animals (eds S. Schwarz, LM Cavaco e J. Shen). 2018. <https://doi.org/10.1128/9781555819804.ch13>
- POIREL, L.; JAYOL, A.; NORDMANN, P. Polimixinas; atividade antibacteriana, teste de suscetibilidade, mecanismos de resistência codificados por plasmídeo e cromossomicamente. **Rev. Clin. Microbiol** 30: 557 - 596. doi: 10.1128 / CMR.00064-16. 2017
- POIREL, L. *et al.* GES-2, a class A beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. **Antim. Agents Chemother**. 2001 Sep;45(9):2598-603.
- PONTES, V.M.O. *et al.* **Perfil de Resistência de *Acinetobacter baumannii* a Antimicrobianos nas Unidades de Terapia Intensiva e Semi-Intensiva do Hospital Geral de Fortaleza.** RBAC. 2016. 38(2): 123-6.
- QUARESMA, É. P. *et al.* Análise da oferta energética-protéica em pacientes internados na UTI de um hospital filantrópico oncológico de Curitiba/PR. **ANAIS DO XI EVINCI—Centro Universitário Autônomo do Brasil —UniBrasil**, 2016.
- QUEENAN, A.M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. **Clin. Microbiol Review**. Rev. 2007;20(3):440-58.
- RAMADAN, R.A. *et al.* Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of carbapenemase genes and E-test evaluation of colistin-based combinations. **Infect. Drug Resist**. 2018 Aug 22;11:1261-1269. doi: 10.2147/IDR.S170233. PMID: 30197524; PMCID: PMC6112795.
- REBELO, A.R. *et al.* **Multiplex PCR para detecção de determinantes de resistência à colistina mediada por plasmídeo, mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4 e mcr-5 para fins de vigilância.** 2018; 23 (6): pii = 17-00672.
- RIBEIRO, V.B. *et al.* Carbapenem-resistant GES-5- producing *Klebsiella pneumoniae* in Southern Brazil. **J. of infec diseases** 2014;18(2):231-2.
- ROBLEDO, I. E. *et al.* Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. **Ant. Agents and Chemoth**, v. 54, n. 3, p. 1354–1357, 2010.

ROCHA, F. R. **Análise molecular da prevalência dos genes beta-lactamases blaCTX-M, blaSHV e blaTEM em *Klebsiella pneumoniae* isoladas de pacientes com diagnóstico de infecção hospitalar na Santa Casa de Misericórdia de Sobral, Ceará.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Campus de Sobral, Universidade Federal do Ceará, Sobral, 2015.

ROCHA, L. et al. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Brazil: susceptibility profile and diversity of oxacillinases. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** 2017;53(6):358-361. doi.org/10.5935/1676-2444.20170057.

ROCHA, F. R. *et al.* High Frequency of Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Nosocomial Strains Isolated from a Teaching Hospital in Brazil. **M. Drug Resist.**, v. 25, p. 909-914, 2019.

ROMANIN, P. *et al.* Multidrug-and extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a tertiary hospital from Brazil: The importance of carbapenemase encoding genes and epidemic clonal complexes in a 10-year study. **M. Drug Resist**, v. 25, n. 9, p. 1365-1373, 2019.

RAWSON, *et al.* Bacterial and fungal co-infection in individuals with 18coronavirus: a rapid review to support COVID-19 antimicrobial prescribing. **Clin Infect Dis.** <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa530> 2020.

RUPPÉ, É.; WOERTHER, P.L.; BARBIER, F. Mecanismos de resistência antimicrobiana em bacilos Gram-negativos. **Ann Intensive Care.** 2015; 5: 61.

SANTOS, P. J. M dos. Avaliação dos fatores associados a infecções por *Acinetobacter baumannii* em pacientes imunodeprimidos em unidade de terapia intensiva." *recima21-Rev. Cien. Multidisciplinar*-ISSN 2675-6218 3.1 (2022): e321172-e321172.

SEVILLANO, E., GALLEGO L., GARCIA-LOBO, J.M. **Primeira detecção da OXA-40 carbapenemase em isolados de *P. aeruginosa*, localizada em um plasmídeo também encontrado em *A. baumannii*.** *Pathol. Biol.* 2009. (*Paris*) 57:493–495.

SILVA, C.H.P.M. **Bacteriologia: um texto ilustrado.** Teresópolis, RJ: Eventos; 1999. p.22-5.

SILVA, G. L. **Infecções causadas por surtos de *Stenotrophomonas maltophilia* em pacientes dialíticos: Uma revisão sistemática/** Gabriel Lima Silva. (Salvador, Bahia): GL, Silva, 2018.

SILVA, T.M.F. *et al.* Infecções hospitalares associadas a bacilos gram-negativos não fermentadores em unidade de terapia intensiva: revisão narrativa. 2021. **Rev. Eletrônica Acervo Saúde.** 13(3),e6685e6685.<https://doi.org/10.25248/reas.e6685>. 2021

SMITH, C.A.; FRASE H.; TOTH, M.; KUMARASIRI, M.; WIAFE, K.; MUNOZ, J. Structural basis for progression toward the carbapenemase activity in the GES family of b-lactamases. **Rev. J. am Chem Soc.** 2012;134(48):19512-5.



SMITH, M.G. *et al.* **Novos insights sobre a patogênese do *Acinetobacter baumannii* revelados por pirosequenciamento de alta densidade e mutagênese por transposon.** *Genes* 2007. *Dev.* 21 : 601-614.

SOUTO, R.; SILVA, B., CARINA, M. Prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. in subgingival biofilm and saliva of subjects with chronic periodontal infection. **J. of Microbiology**, [s.l.], v. 45, n. 2, p.495-501, jun. 2014. FapUNIFESP (SciELO).

STRATEVA, T.; YORDANOV, D. - *Pseudomonas aeruginosa* - A phenomenon of bacterial resistance. **J. of Microbiology** 58(9) (2009) 1133–1148.

SUZUKI, T. *et al.* Role of pvdE Pyoverdine Synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* Keratitis. *Cornea*, [s.l.], p.1-5, set. 2018. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health).

TAVARES, A. B. T. **Internship and Monograph reports entitled *Pseudomonas aeruginosa* and its Resistance to Beta-Lactams, Aminoglycosides and Fluoroquinolones.** Relatórios de Estágio e Monografia. faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra; Farmácia de Celas-Coimbra e Bluepharma. 2020.

TERESA, G.G., PAULA BLANCO, J.L. **Mecanismos de resistência antimicrobiana em *Stenotrophomonas maltophilia*: uma revisão do conhecimento atual.** *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 18:4,335-347.

TOKAR, K.G.; BEDENIC, B. Antimicrobial susceptibility and characterization of metallo- $\beta$ -lactamases, extended-spectrum  $\beta$ -lactamases, and carbapenemases of *Bacillus cereus* isolates. ANAIS – 21ª SEMOC, Salvador, 22 a 26 de outubro de 2018 | ISSN 2448-1858 | 2129 **Microbial Pathogenesis**, v. 118, p. 140-145, Mar. 2018. ISSN 0882-4010. doi: 10.1016/j.micpath.2018.03.026.

TUMBARELLO, M. V. *et al.* Preditores de mortalidade em infecções da corrente sanguínea causadas por *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC: importância da terapia combinada. **Clin Infect Dis.** 2012; 55(7): 943–950. pmid:22752516.

TURTON, J.F. *et al.* *Acinetobacter baumannii* by detection of the blaOXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species. **J. Clin Microbiol.** 2006;44(8):2974-6.

VANDEPLASSCHE, E. *et al.* In vitro evolution of *Pseudomonas aeruginosa* AA2 biofilms in the presence of cystic fibrosis lung microbiome members. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.1-5, 6 set. 2019.

VIANA, G.F. *et al.* Can ampicillin/sulbactam resistance in *Acinetobacter baumannii* be predicted accurately by disk diffusion? **J. Glob Antimicrob Resist.** 2013 Dec;1(4):221-22.

WANG, C.H. *et al.* Comparações entre pacientes com bacteremia monomicrobiana *Stenotrophomonas maltophilia* resistente a trimetoprima-sulfametoxazol e resistente a trimetoprima-sulfametoxazol: um estudo retrospectivo de 10 anos **J. Microbiol. Immunol.** 2016. *Infectar.* 10.1016/j.jmii.2014.06.

WANG, Y. et al. Prevalência, fatores de risco, resultados e epidemiologia molecular de *Enterobacteriaceae* positiva para *mcr-1* em pacientes e adultos saudáveis da China: um estudo epidemiológico e clínico. 2017 **Lancet Infect. Dis.** 17, 390–399.

WHO, World Health Organization (CH). **Report on the burden of endemic health care associated infection worldwide: a systematic review of the literature.** Geneva: The critical role of infection prevention and control. 2017

YANG, F.J. et al. **Prevalência e destino dos genes de carbapenemases em uma estação de tratamento de águas residuais no norte da China.** 2016 PLoS ONE 11(5): e0156383.

YONG, D. et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, blaNDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. **J. Antimicrobial agents and chemotherapy** 2009;53(12):5046-54.



## APÊNDICE I



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

*Campus Sobral*

### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)**

#### **Caro participante:**

Sou enfermeiro e estou desenvolvendo uma pesquisa científica intitulada “Estudo da diversidade genômica associada a resistência antimicrobiana em enterobácteriaceae e *Pseudomonas* ssp. isoladas de pacientes assistidos num hospital de grande porte no Norte do Ceará”, sobre a ocorrência de bactérias que causam infecções hospitalares e na comunidade e que são resistentes a muitos antibióticos. Neste sentido, solicito sua colaboração na participação da pesquisa, aceitando participar da coleta.

Os dados serão apresentados na Universidade Federal do Ceará – Sobral e divulgados junto à comunidade acadêmica, respeitando o caráter confidencial das identidades, sob a responsabilidade do pesquisador. Garanto-lhe que sua participação ficará no anonimato, não será divulgado seu nome. Objetivamos com esta pesquisa verificar a resistência de bactérias que causam diversas infecções e são prevalentes na comunidade e no ambiente hospitalar.

Você tem o direito de não participar dessa pesquisa se assim o desejar, mas seria importante sua participação. Aceitando participar, se por qualquer motivo, durante o andamento da pesquisa, resolver desistir, tem toda liberdade para retirar seu consentimento a qualquer momento. Reforço que sua colaboração e participação poderão trazer benefícios para o desenvolvimento científico. O procedimento incorrerá em riscos mínimos, uma vez que será assegurada a confidencialidade e a privacidade, e a não estigmatização, garantindo a não utilização das informações em prejuízo das pessoas e/ou das comunidades, e que o material biológico e os dados obtidos na pesquisa serão utilizados exclusiva-

mente para a finalidade prevista no seu protocolo. Além disso, você poderá ser beneficiado na medida que a equipe médica tomará conhecimento do patógeno isolado e do seu perfil de resistência a antibióticos, facilitando o seu tratamento.

Ressalto que não será realizada coleta adicional de sangue ou qualquer outra amostra biológica, ou seja, o isolamento bacteriano será realizado a partir da amostra solicitada e já coletada pela equipe médica do Hospital Regional Norte.

Para possíveis esclarecimentos entrar em contato comigo no endereço: Rua professora Hilma Girão Borges, 205 – Campos dos Velhos – CE, 62030-187, telefone (88) 99604-7090 ou contato com o laboratório de microbiologia da UFC/Sobral, no endereço: Avenida Comandante Maurocelio Rocha Pontes, 100 - Derby Clube - 62042-280.

Atenciosamente,

---

Assinatura do participante

---

Pesquisador: Carlos Victor Fontenele Pinheiro

### Consentimento Pós-Informado

Declaro que tomei conhecimento do estudo que pretende avaliar a ocorrência de bactérias que causam infecções hospitalares e a sensibilidade dessas bactérias a diferentes antibióticos cujo título é “ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÔMICA ASSOCIADA À RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter ssp* e *Stenotrophomonas maltophilia* ISOLADAS DE PACIENTES INTERNADOS NO HOSPITAL REGIONAL NORTE EM SOBRAL - CE”, realizado pelo pesquisador Carlos Victor Fontenele Pinheiro. Compreendi seus propósitos e, concordo em participar da pesquisa, não me oponho à coleta da amostra biológica, e também sei que em qualquer momento posso retirar meu consentimento em participar da mesma.

Sobral, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2021.

Ciente:

\_\_\_\_\_

Assinatura do Sujeito, responsável ou testemunha

\_\_\_\_\_

Assinatura do Pesquisador

## APÊNDICE II

### Protocolo de extração de DNA-plasmidial (Adaptado)

1. Bata com os dedos nas laterais do tubo de cultura para ressuspender as células da bactéria.
2. Marque um tubo de microcentrífuga com a letra da turma e número do grupo.
3. Transfira 1.500 µl da suspensão da bactéria para o tubo.
4. Feche a tampa e coloque o tubo em uma configuração equilibrada no rotor da microcentrífuga. Centrifugue por 15 segundos para precipitar as células.
5. Descarte o sobrenadante em um Erlenmeyer de descarte para posterior autoclavagem.
6. Adicione ao tubo 100 µl da solução GTE gelada. Ressuspenda o precipitado pipetando a solução várias vezes. Olhe o tubo contra a luz para verificar se a suspensão está homogênea, ou seja, se não há grumos de células visíveis.
7. Adicione ao tubo 200 µl da solução de SDS/NaOH à temperatura ambiente. Feche a tampa e misture as soluções invertendo o tubo cerca de 5 vezes.
8. A suspensão vai se tornar relativamente transparente.
9. Adicione ao tubo 150 µl da solução de acetato de potássio/ácido acético (KOAc) gelada. Feche a tampa e misture as soluções invertendo o tubo por 5 vezes. Um precipitado branco aparecerá imediatamente.
10. Coloque o tubo no gelo por 5 minutos.
11. Coloque o tubo em uma configuração equilibrada no rotor da microcentrífuga e centrifugue por 5 minutos para obter um precipitado.
12. Transfira 400 µl do sobrenadante para um tubo limpo de 1,5 ml. Evite pipetar o precipitado. Retire qualquer precipitado que tenha ficado aderido à parede externa da ponteira antes de transferir o sobrenadante. Descarte o tubo usado contendo o precipitado.
13. Adicione ao tubo contendo o sobrenadante, 400 µl de isopropanol. Feche a tampa e misture as soluções invertendo o tubo por 5 vezes. Deixe o tubo à temperatura ambiente por apenas dois minutos.
14. 15. Coloque o tubo em uma configuração equilibrada no rotor da micro-centrífuga e centrifugue por 5 minutos para precipitar os ácidos nucleicos. Alinhe o tubo no rotor de modo que a alça da tampa fique voltada para fora. O resíduo de ácido nucleico, visível ou não, ficará no fundo do tubo sob a alça, durante a centrifugação.
15. Descarte o sobrenadante do tubo. Tome cuidado para não ressuspender o precipitado de ácidos nucleicos. Retire o máximo possível do álcool remanescente com uma toalha de papel.
16. Adicione ao tubo 200 µl de etanol 70% e feche a tampa. Bata com os dedos na lateral do tubo por várias vezes para lavar os precipitados.
17. Coloque o tubo em uma configuração equilibrada no rotor da microcentrífuga e centrifugue por 2-3 minutos para coletar de novo o precipitado de ácidos nucleicos.
18. Descarte o sobrenadante do tubo.
19. Assegure-se de que o precipitado de ácidos nucleicos está seco e que todo o etanol evaporou.
20. Adicione 40-100 µl de TE a cada tubo. Ressuspenda o precipitado pipetando várias vezes a solução. Lave as paredes do tubo várias vezes, principalmente na área em que o precipitado deve ter-se formado durante a centrifugação (abaixo da alça da tampa). Certifique-se de que todo o DNA está dissolvido e de que não restam partículas na ponteira ou na parede do tubo.

### APÊNDICE III

#### Protocolo de extração de DNA-cromossômico (Adaptado)

- 1) Limpar superfície com álcool 70% e prepara materiais;
- 2) Reativa amostras em caldo BHI (50 µL de amostras em 5 mL de caldo BHI);
- 3) Após crescimento do microrganismo colocar de 2000 a 1500 µL da suspensão bacteriana ou fúngica no microtubo, centrifugar por 4.500 g por 3 minutos e descartar sobrenadante (pode somente verter o microtubo cuidadosamente);
- 4) Adicionar ao pellet, obtido no passo 3, 200 µL de Tampão 1 e 200 µL da solução A (Fenol [25 mL] + Cloroformio [24 mL] + Alcool isomilico [01 mL] na proporção 25:24:1, respectivamente) e ressuspender pellet;
- 5) Adicionar 3 a 4 beads de sílica e agitar em dissipador por 5 minutos;
- 6) Adicionar 200 µL do Tampão 2 e agitar suavemente por 30 segundos;
- 7) Centrifugar por 12.000 g por 5 minutos;
- 8) Transferir cuidadosamente sobrenadante para novo microtubo (de modo algum tira fase oleosa ou branca);
- 9) Adicionar 1000 µL de álcool etílico 100% levar ao freezer -20 °C por 30 minutos mínimos (pode ficar até o dia seguinte em overnight);
- 10) Centrifugar por 12.000 g por 5 minutos e desprezar sobrenadantes (pode somente verter o microtubo cuidadosamente);
- 11) Deixar os microtubos virados para baixo e esperar secar TOTALMENTE pode ser 10 minutos ou mais;
- 12) Adicionar 100 a 400 µL de Tampão 2, misturar com a ponteira e incubar em “banho Maria” a 60 °C por 30 minutos;
- 13) Realizar quantificação de DNA na amostras;
- 14) Armazenar em freezer -20 °C até realizar procedimentos de PCr.

Observação: Procedimento dura em média 2 a 3 horas a depender do manipulador e da quantidade de amostras.

## ANEXO 01



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÔMICA ASSOCIADA À RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM ENTEROBÁCTERIAS E *Pseudomonas* sp. ISOLADAS DE PACIENTES ASSISTIDOS NUM HOSPITAL DE GRANDE PORTE NO NORTE DO CEARÁ

**Pesquisador:** CARLOS VICTOR FONTENELE PINHEIRO

**Área Temática:**

**Versão:** 2

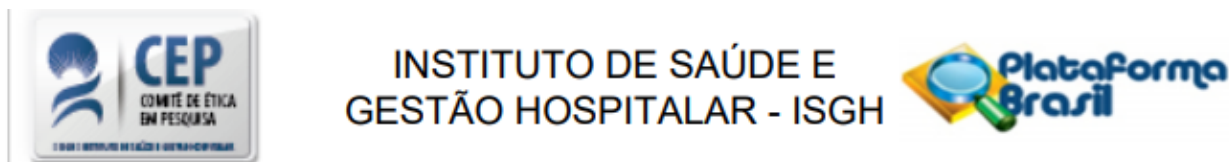
**CAAE:** 35097420.7.0000.5684

**Instituição Proponente:** INSTITUTO DE SAUDE E GESTAO HOSPITALAR

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 4.313.543



Continuação do Parecer: 4.313.543

Cronograma	Cronograma.pdf	08:35:57	FONTENELE PINHEIRO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO.pdf	05/06/2020 08:35:12	CARLOS VICTOR FONTENELE PINHEIRO	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

FORTALEZA, 01 de Outubro de 2020

\_\_\_\_\_  
**Assinado por:**  
**Jamille Soares Moreira Alves**  
**(Coordenador(a))**