



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS FLORIANÓPOLIS - CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Daniela Cristina Tartari

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DA RESISTÊNCIA AOS β -LACTÂMICOS E ÀS
POLIMIXINAS EM BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS DO GRUPO ESKAPE
ISOLADAS EM HOSPITAIS DE SANTA CATARINA**

Florianópolis

2020

Daniela Cristina Tartari

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DA RESISTÊNCIA AOS β -LACTÂMICOS E ÀS
POLIMIXINAS EM BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS DO GRUPO ESKAPE
ISOLADAS EM HOSPITAIS DE SANTA CATARINA**

Tese submetida ao Programa de Farmácia da
Universidade Federal de Santa Catarina como requisito
parcial para a obtenção do título de Doutora em Farmácia
Orientadora: Profa. Dra. Thaís Cristine Marques Sincero

Florianópolis

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Tartari, Daniela Cristina
Caracterização genética da resistência aos Beta
lactâmicos e às polimixinas em bactérias gram-negativas do
grupo ESKAPE isoladas em hospitais de Santa Catarina /
Daniela Cristina Tartari ; orientador, Thaís Cristine
Marques Sincero , 2020.
140 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, , Programa de Pós-Graduação em , Florianópolis,
2020.

Inclui referências.

1. . 2. Resistência bacteriana. 3. Grupo ESKAPE de
bactérias . 4. Sequenciamento de nova geração. I. , Thaís
Cristine Marques Sincero. II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em . III. Título.

Daniela Cristina Tartari

Caracterização genética da resistência aos β -lactâmicos e às polimixinas em bactérias gram-negativas do grupo ESKAPE isoladas em hospitais de Santa Catarina

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Marcelo Pillonetto, Dr.

Instituição PUC-PR

Mara Cristina Scheffer, Dra.

Instituição UFSC

Profª. Maria Luiza bazzo, Dra.

Instituição UFSC

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutora em Farmácia

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof.(a) Thaís Cristine Marques Sincero, Dr.(a)

Orientador(a)

Florianópolis, 2020

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, aos meus pais que me deram todo o apoio necessário para minha formação, desde o colégio até a faculdade. Sem vocês nada seria possível.

Ao Alex por me apoiar incondicionalmente em tudo que faço. Obrigada pelos milhões de mimos e por cuidar de mim nesse final que é sempre desafiador, ainda mais no ano de 2020! Dividir minha vida contigo foi o melhor dos meus acertos.

À professora Thaís pela oportunidade e por me aceitar ainda na época do mestrado sem me conhecer. Um exemplo de ser humano, uma calma invejável e muita alegria pra quem convive de perto.

Às suris, amigas que levo no coração e na pele. O clichê “não tenho palavras para agradecer” é perfeito para expressar o que sinto por vocês. Obrigada por tanto e por serem o meu pra sempre.

À Ana, que mesmo de longe e me matando de saudades, sempre me alegra com milhões de vídeos dos gatos mais fofos que existem.

Às minhas companheiras Caetana, Giuliana e Clarice, obrigada pela amizade, pelos cafés cheios de delícias, pelas conversas e risadas. A convivência com vocês tornou essa fase muito mais leve e alegre.

Novamente à Caetana, por ser minha companheira de laboratório e por compartilhar comigo uma bola de cristal que só nós entendemos! Obrigada pelos ensinamentos de bioinformática e análises de dados do sequenciamento, sem você não teria dado certo.

Às “crianças do laboratório”, carinhosamente apelidadas dessa maneira por trazerem alegria e ânimo para as jovens senhoras do laboratório MIMA. Carol, Lucas, Dani e Fran, continuem com essa alegria sempre!

A todo o pessoal dos laboratórios do subsolo do HU, sempre tinha uma conversa boa e aconchegante na copa.

À UFSC, por fazer parte da minha formação no mestrado e doutorado, além da oportunidade de ser professora substituta no departamento de Análises Clínicas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela oportunidade e pelo apoio financeiro desde o meu mestrado até meu doutorado.

Por todas as pessoas que passaram por mim e, de alguma maneira, fizeram a diferença em todos esses anos de UFSC. Obrigada.

RESUMO

Infeções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) são consideradas como um problema de saúde pública, sendo responsáveis por altas taxas de morbimortalidade no mundo todo. A maioria dessas infecções são causadas por bactérias resistentes a várias classes de antimicrobianos, como as bactérias Gram-negativas do grupo ESKAPE: *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* e *Enterobacter spp.* Essas bactérias são resistentes a vários antimicrobianos, como os carbapenêmicos, uma das últimas alternativas para o tratamento de infecções por Gram-negativos. O objetivo deste estudo foi caracterizar as bactérias Gram-negativas do grupo ESKAPE isoladas em Santa Catarina, avaliando os mecanismos de resistência e a circulação dessas bactérias entres os hospitais do estado. Ao todo, foram selecionados 153 isolados (Jan-2018 a Jan-2019) de 11 hospitais distribuídos entre as 5 regiões do estado. O teste de sensibilidade aos antimicrobianos foi feito seguindo as determinações do CLSI e BrCAST. A detecção dos genes de resistência associados à β -lactamases de espectro estendido (ESBL), carbapenemases, metalo- β -lactamases e oxacilinases foi realizada pela técnica de PCR em tempo real. A avaliação da similaridade dos isolados foi feita por PFGE e para o sequenciamento de alguns isolados foi escolhido o sequenciamento de última geração da plataforma Illumina. Dados como MLST, resistoma e grupo de incompatibilidade de plasmídeos foram detectados por meio da plataforma do *Center for Genomic Epidemiology*. Entre os 31 isolados de *K. pneumoniae*, a maioria foi classificado como MDR, possível XDR (77,4%); o gene mais frequente foi *bla_{SHV}* (100%) e a carbapenemase mais encontrada foi a NDM (15, 48%); no PFGE foram observados 27 genótipos formando 6 grupos de similaridade com 3 perfis clonais. Entre os 5 isolados de *Enterobacter spp.*, quatro foram classificados como XDR e um como MDR e os genes mais encontrados foram *bla_{TEM}* e *bla_{KPC}*; foram classificados em 3 genótipos e houve a formação de um grupo de similaridade composto por 3 amostras clonais. Os 66 isolados de *A. baumannii* foram na sua maioria classificados como XDR (62%); todos os isolados apresentaram positividade para o gene *bla_{OXA-51}*, 92% para *bla_{OXA-23}* e 9% para *bla_{OXA-24}*. Um isolado apresentou a coprodução das oxacilinases OXA-23 e OXA-24, sendo o primeiro relato do estado. Na espécie *P. aeruginosa* os 51 isolados foram majoritariamente classificados como MDR e XDR, e o gene mais observado foi o *bla_{CTX-M2}* (10%). O PFGE gerou 45 genótipos distintos que formaram 11 grupos de similaridade com 5 perfis clonais. Para as 4 espécies, o PFGE revelou a circulação de clones e isolados intimamente relacionados em todo estado, bem como a permanência de clones por vários meses nos hospitais. Os isolados de *K. pneumoniae* sequenciados foram classificados no complexo clonal CC258 que é considerado um clone disseminado no mundo todo. Um isolado apresentou a coprodução dos genes *bla_{NDM}* e *bla_{VIM}*, sendo o primeiro relato genômico do Brasil. Um isolado de *P. aeruginosa* ST312 foi positivo para o gene *bla_{KPC}* que se encontrava em um plasmídeo IncU, essa associação nunca foi descrita e esse é o primeiro reporte genômico do gene *bla_{KPC}* em um isolado de *P. aeruginosa* no sul do Brasil. Os dados deste estudo enriquecem a epidemiologia de Santa Catarina, mostram novos tipos de resistências que foram detectadas pela primeira vez no estado e uma alta circulação de isolados intimamente relacionados e clones nas 5 regiões do estado. Esses dados podem ser úteis para medidas que visam a diminuição de IRAS no estado de Santa Catarina.

Palavras-chaves: grupo ESKAPE, resistência a antimicrobianos, PFGE, sequenciamento de nova geração.

ABSTRACT

Genetic characterization of resistance to β -lactamics and polymyxins in Gram-negative bacteria of the ESKAPE group isolated in Santa Catarina hospitals

Healthcare-related infections (HAIs) are considered a public health problem and are responsible for high rates of morbidity and mortality worldwide. Most of these infections are caused by bacteria resistant to various classes of antimicrobials, such as Gram-negative bacteria from the ESKAPE group: *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, and *Enterobacter* spp. These bacteria are resistant to several antimicrobials, such as carbapenems, one of the last alternatives for the treatment of Gram-negative infections. The objective of this study was to characterize the Gram-negative bacteria of the ESKAPE group in the state of Santa Catarina, evaluating the resistance mechanisms and the circulation of these bacteria among hospitals in the state. In all, 153 isolates (Jan-2018 to Jan-2019) were selected from 11 hospitals distributed across 5 regions of the state. The sensitivity test to antimicrobials was performed following the determinations of CLSI and BrCAST. The detection of resistance genes associated with extended-spectrum β -lactamases (ESBL), carbapenemases, metallo- β -lactamases, and oxacillinases was performed using the Real-time PCR technique. The evaluation of the similarity of the isolates was made by PFGE and for the sequencing of some isolates, the last generation sequencing of the Illumina platform was chosen. Data such as MLST, resistome, and plasmid incompatibility groups were detected by the Center for Genomic Epidemiology platform. Among the 31 isolates of *K. pneumoniae*, most were classified as MDR, possible XDR (77.4%); the most frequent gene was *bla_{SHV}* (100%) and the most commonly found carbapenemase was NDM (15, 48%); in the PFGE, 27 genotypes were observed, forming 6 similarity groups with 3 clonal profiles. Among the 5 isolates of *Enterobacter* spp., Four were classified as XDR and one as MDR and the most found genes were *bla_{TEM}* and *bla_{KPC}*; were classified into 3 genotypes and a similarity group formed by 3 clonal samples was formed. The 66 isolates of *A. baumannii* were mostly classified as XDR (62%); all isolates were positive for the *bla_{OXA-51}* gene, 92% for *bla_{OXA-23}*, and 9% for *bla_{OXA-24}*, one isolate co-produced the oxacillinases OXA-23 and OXA-24, being the first report in the state. In *P. aeruginosa*, the 51 isolates were mostly classified as MDR and XDR and the most observed gene was *bla_{CTX-M2}* (10%). The PFGE generated 45 distinct genotypes that formed 11 similarity groups with 5 clonal profiles. For the 4 species, the PFGE revealed the circulation of clones and closely related isolates throughout the state, as well as the permanence of clones for several months in hospitals. The *K. pneumoniae* isolates sequenced were classified in the CC258 clonal complex, which is considered a clone disseminated worldwide. One isolate co-produced the *bla_{NDM}* and *bla_{VIM}* genes, being the first genomic report from Brazil. An isolate of *P. aeruginosa* ST312 was positive for the *bla_{KPC}* gene found in an IncU plasmid, this association has never been described and this is the first genomic report of the *bla_{KPC}* gene in a *P. aeruginosa* isolate in southern Brazil. The data from this study enrich the epidemiology of Santa Catarina, show new types of resistance that were detected for the first time in the state, and high circulation of closely related isolates and clones in the 5 regions of the state. These data can help to reduce HAIs in the state of Santa Catarina.

Keywords: ESKAPE group, antimicrobial resistance, PFGE, new generation sequencing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática das β -lactamases.....	25
Figura 2. Placa representativa de microdiluição em caldo para polimixina.....	39
Figura 3 - Distribuição dos isolados entre os hospitais das 5 regiões do estado de Santa Catarina	53
Figura 4. Distribuição dos 153 isolados entre não-fermentadores e enterobactérias.	54
Figura 5. Dendrograma dos isolados de <i>K. pneumoniae</i> formado pelos genótipos e grupos de similaridade, associados ao perfil e genes de resistência.	94
Figura 6. Dendrograma dos isolados de <i>Enterobacter</i> spp. formado pelos genótipos e grupo de similaridade, associados ao perfil e genes de resistência.	96
Figura 7. Dendrograma dos isolados de <i>A. baumannii</i> formado pelos genótipos e grupos de similaridade, associados ao perfil e genes de resistência.	98
Figura 8. Dendrograma dos isolados de <i>P. aeruginosa</i> formado pelos genótipos e grupos de similaridade, associados ao perfil e genes de resistência.	101
Figura 9. Alinhamento dos plasmídeos do grupo IncU que carregam o gene <i>bla_{KPC}</i>	107
Figura 10. Contexto genético em que o gene <i>bla_{KPC}</i> estava inserido no isolado 1.4A de <i>K. pneumoniae</i>	109
Figura 11. Alinhamento do contexto genético em que se encontra o <i>bla_{KPC}</i> do isolado 1.4A com um plasmídeo IncN.....	110
Figura 12. Alinhamento dos plasmídeos IncC dos isolados 1.4A e 2.16C.....	112
Figura 13. Alinhamento dos plasmídeos IncN2 dos isolados 2.16C e 5.36A.	114

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Antimicrobianos utilizados e bactérias testadas.	36
Quadro 2. Genes de resistência selecionados para cada bactéria.	40
Quadro 3. Iniciadores e genes amplificados.	41
Quadro 4. Controles positivos dos genes de resistência.	42
Quadro 5. Iniciadores para detecção de <i>mcr- 1, 2, 3, 4 e 5</i> por multiplex PCR.	45
Quadro 6. Distribuição espacial e temporal dos isolados de janeiro de 2018 a janeiro de 2019 que foram selecionadas para o projeto.	55
Quadro 7. Perfil de sensibilidade dos isolados de enterobactérias.	61
Quadro 8. Perfil de sensibilidade dos isolados de <i>A. baumannii</i>	66
Quadro 9. Perfil de sensibilidade dos isolados de <i>P. aeruginosa</i>	72
Quadro 10. Isolados selecionados para o sequenciamento do genoma completo.	103
Quadro 11. Parâmetros de qualidade da montagem dos genomas dos isolados.	104
Quadro 12. Relação do perfil genotípico (Resistoma) com o fenotípico (TSA).	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Critérios para interpretação da PFGE	49
Tabela 2. Resultado de disco-eluição e microdiluição em caldo de polimixinas.	76

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. As 5 regiões e seus hospitais com respectivos números de isolados de cada espécie.	57
Gráfico 2. Relação dos 13 genes de resistência encontrados divididos entre os grupos de β - lactamases.....	81
Gráfico 3. Relação dos 13 genes de resistência encontrados entre os 153 isolados, associados com as 4 espécies de bactérias.....	82
Gráfico 4. Relação de cada uma das 4 espécies de bactérias com os genes de resistência encontrados, mostrando a taxa de positividade para cada gene.	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CDC: do inglês, *Centers for Disease Control and Prevention*

CIM: Concentração inibitória mínima

Cq: do inglês, *quantification cycle* (ciclo de quantificação)

CRE: Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*

EUA: Estados Unidos da América

ECDC: do inglês *European Centre for Disease Prevention and Control*

ESBL: β -lactamases de espectro estendido

IRAS: Infecções relacionadas à assistência à saúde

LACEN/SC: Laboratório Central de Saúde Pública/Santa Catarina

MDR: multidroga-resistente

NCBI: do inglês, *National Center for Biotechnology Information*

OMS: Organização Mundial de Saúde

OXA: oxacilinases

PCR: Reação em cadeia da Polimerase

PDR: pandroga-resistente

PFGE: do inglês, *Pulsed-field Gel Electrophoresis*

TSA: Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

UTI: Unidade de terapia intensiva

WGS: do inglês, *Whole-Genome Sequencing*

XDR: extensivamente resistente

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	OBJETIVOS	17
1.1.1	Objetivo geral	17
1.1.2	Objetivos específicos	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	INFECCÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE (IRAS).....	18
2.2	RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS	20
2.3	BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS	23
2.4	BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS DO GRUPO ESKAPE	27
2.5	TÉCNICAS MOLECULARES E FENOTÍPICAS	30
3	METODOLOGIA	33
3.1	ASPECTOS ÉTICOS	33
3.2	HOSPITAIS	33
3.3	isolados bacterianos	34
3.3.1	Processamento dos isolados no LACEN/SC	34
3.3.2	Processamento dos isolados no Laboratório MIMA/UFSC	35
3.4	TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS (TSA)	35
3.5	DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE ÀS POLIMIXINAS	37
3.5.1	Disco-eluição em caldo	37
3.5.2	Microdiluição em caldo	38
3.6	DETECÇÃO MOLECULAR DE GENES DE RESISTÊNCIA	39
3.6.1	Desenho dos iniciadores para a PCR	40
3.6.2	Extração de DNA genômico total	43
3.6.3	PCR em tempo real para detecção de genes de resistência	43
3.6.4	Multiplex PCR para detecção de 5 variantes do gene <i>mcr</i>	44
3.7	TIPAGEM MOLECULAR – AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO CLONAL... 45	
3.7.1	Eletroforese de campo pulsado (PFGE)	46
3.7.1.1	<i>Preparação dos blocos com DNA</i>	46
3.7.1.2	<i>Clivagem do DNA com enzima de restrição</i>	47
3.7.1.3	<i>Eletroforese em gel de agarose em campo pulsado</i>	47
3.7.1.4	<i>Análise dos padrões moleculares</i>	48
3.8	SEQUENCIAMENTO DO GENOMA COMPLETO.....	49

3.8.1	Sequenciamento	49
3.8.2	Análise computacional dos resultados	49
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1	ISOLADOS BACTERIANOS	52
4.2	PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS	57
4.2.1	Disco-difusão em ágar	57
4.2.2	Classificação em MDR, XDR e PDR.....	58
4.2.2.1	<i>Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos isolados de enterobactérias</i>	59
4.2.2.2	<i>Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos isolados de A. baumannii</i>	64
4.2.2.3	<i>Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos isolados de P. aeruginosa</i>	68
4.2.3	Disco-eluição e microdiluição em caldo das polimixinas.....	73
4.3	DETECÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA.....	79
4.4	TIPAGEM UTILIZANDO PFGE	91
4.4.1	Tipagem dos isolados de <i>K. pneumoniae</i>	92
4.4.2	Tipagem dos isolados de <i>Enterobacter</i> spp.	95
4.4.3	Tipagem dos isolados de <i>A. baumannii</i>	96
4.4.4	Tipagem dos isolados de <i>P. aeruginosa</i>	99
4.5	SEQUENCIAMENTO DO GENOMA COMPLETO.....	102
4.6	FEEDBACK PARA O LACEN/SC	117
5	CONCLUSÃO	118
	REFERÊNCIAS	120
	APÊNDICE A – Figura mostrando a produção de pigmentos em isolados de <i>P. aeruginosa</i>.	135
	ANEXO A – Categorias de antimicrobianos que devem ser testadas para enterobactérias.	136
	ANEXO B – Categorias de antimicrobianos que devem ser testadas para <i>A. baumannii</i>.	138
	ANEXO C – Categorias de antimicrobianos que devem ser testadas para <i>P. aeruginosa</i>.	139
	ANEXO D – Exemplos de padrões possíveis de sensibilidade antimicrobiana.	140

1 INTRODUÇÃO

Infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) já são consideradas o evento adverso mais comum entre os serviços de saúde e têm ameaçado a segurança dos pacientes em todo o mundo (HAQUE, SARTELLI, *et al.*, 2018). Sabe-se que as IRAS levam à considerável elevação dos custos para as instituições de saúde, devido ao tratamento do paciente e, também, ao aumento do seu tempo de internação. Observam-se elevadas taxas de morbidade e mortalidade nos serviços de saúde em todo Brasil em razão das IRAS (ANVISA, 2013b, PADOVEZE, FORTALEZA, 2014).

As IRAS possuem um papel de grande relevância para a saúde pública de todos os países, juntamente com o aumento da resistência aos antimicrobianos. Destaca-se também que os países em desenvolvimento sofrem com maior prevalência de IRAS, podendo ser até 20 vezes superior aos países desenvolvidos (PADOVEZE, FORTALEZA, 2014). A Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece o fenômeno das IRAS como um problema de saúde pública e preconiza que a autoridade de saúde responsável deva desenvolver um programa de âmbito nacional ou regional para auxiliar os hospitais na redução das infecções relacionadas aos cuidados de saúde (WHO, 2014b).

Infecções causadas por bactérias resistentes a múltiplas classes de antimicrobianos são uma realidade cada vez mais comum em todos os âmbitos de saúde, sendo um tema diretamente relacionado com o monitoramento e vigilância das de IRAS (ANVISA, 2013b).

A resistência aos antimicrobianos se comporta como uma ameaça crescente e vem preocupando todos os países, principalmente pela ampla disseminação de bactérias multirresistentes que não respondem aos tratamentos normalmente utilizados para as infecções comuns que causavam, tornando-se um desafio para serem tratadas. Além disso, muitas dessas infecções são causadas por bactérias resistentes a várias classes de antimicrobianos, as chamadas bactérias multidroga resistentes (MDR) (CDC, 2013). A resistência aos antimicrobianos é considerada um problema não somente individual, mas também para a medicina moderna, para os estabelecimentos de saúde e para as áreas de agricultura e veterinária (CDC, 2017).

A disseminação da resistência é favorecida de diversas maneiras, como pelo uso indevido de antimicrobianos, pela falta de programas de prevenção às IRAS e também pela vigilância inadequada na regulação do uso dos medicamentos antimicrobianos (WHO, 2015b). O uso indiscriminado de antimicrobianos em humanos, animais e na agricultura, cria condições para a

mobilização dos elementos de resistência entre as bactérias e é considerado como a maior pressão seletiva que leva à emergência de bactérias MDR (DE OLIVEIRA, VAN DER SAND, 2016).

O aumento da incidência de infecções por bactérias Gram-negativas resistentes aos antimicrobianos, tornou-se a questão mais urgente entre todas as resistências bacterianas. As enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos são responsáveis por mais de 9.000 IRAS a cada ano, de forma que o CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) classificou-as como ameaça grave. Nos Estados Unidos da América (EUA), estima-se que 12.000 infecções por ano sejam causadas por *Acinetobacter* spp., sendo que 7.300 são por isolados multirresistentes que causam em torno de 500 mortes anualmente. Para *P. aeruginosa*, a estimativa é de 51.000 casos de infecções, sendo que 6.700 são por bactérias MDR com 400 mortes por ano (CDC, 2013). Um estudo relatou uma taxa de mortalidade duas vezes maior em pacientes com enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos. Comparando-se com casos de infecção por bactérias sensíveis, a mortalidade atribuída é maior que 44% em pacientes com bactérias resistentes (VASOO, BARRETO, *et al.*, 2015).

Entre as bactérias Gram-negativas, destacam-se as pertencentes ao grupo ESKAPE, um acrônimo para as espécies de bactérias Gram-positivas (*Enterococcus* spp. e *Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp), respectivamente, que são listadas pela OMS como bactérias resistentes com prioridade crítica na pesquisa (WHO, 2017). A resistência antimicrobiana, principalmente por patógenos do grupo ESKAPE, está associada a um alto risco de mortalidade e maiores custos econômicos (FOUNOU, FOUNOU, *et al.*, 2017).

A OMS, desde 2001, chama a atenção para esse problema mundial da crescente resistência bacteriana aos antimicrobianos, especialmente para as infecções associadas aos cuidados à saúde. Em 2015, a Assembleia Mundial de Saúde aprovou um Plano de Ação Global em Resistência Microbiana, com o objetivo geral de assegurar a capacidade de tratar e prevenir doenças infecciosas. Para alcançar esse objetivo, foram estabelecidos cinco objetivos estratégicos: 1) melhorar a consciência e a compreensão da resistência antimicrobiana; 2) fortalecer o conhecimento por meio da vigilância e investigação; 3) reduzir a incidência de infecção por meio de saneamento eficaz, higiene e medidas de prevenção de infecção; 4) otimizar a utilização de agentes antimicrobianos na saúde humana e animal; e 5) garantir o investimento sustentável em

novos medicamentos, diagnósticos, vacinas e outras intervenções para as necessidades de todos os países (WHO, 2015a, b, WHO, FAO, *et al.*, 2016).

O plano de ação reforça a necessidade de uma abordagem envolvendo vários setores, tais como a medicina humana, veterinária e a agricultura, trabalhando com o conceito de “one health” (saúde-única). Esse conceito é bastante abordado mundialmente como uma ferramenta eficaz para o combate da resistência bacteriana (WHO, 2015a).

Em vista do exposto, percebemos que o monitoramento do surgimento de novos mecanismos de resistência e a vigilância epidemiológica referentes à incidência de IRAS e de microrganismos multirresistentes são etapas críticas para o norteamo de estratégias de prevenção e controle, assim como para o acompanhamento da efetividade das intervenções de saúde pública e detecção de novos padrões e tendências. Deste modo, a pesquisa epidemiológica dos genes de resistência circulantes é fundamental para o conhecimento dos dados existentes no estado de Santa Catarina e dessa forma tornar as medidas de prevenção mais efetivas.

Por meio de técnicas de biologia molecular como a tipagem genética, utilizando a eletroforese de campo pulsado (PFGE), será possível avaliar a distribuição clonal dos isolados, podendo identificar se os surtos causados pelas bactérias MDR dentro de um hospital ou entre as instituições diferentes, fazem parte de um mesmo clone ou não.

A realização deste projeto em várias instituições do estado, avaliando as bactérias de forma fenotípica e genotípica é inédita no estado de Santa Catarina/Brasil, pois há apenas poucos dados publicados individualmente por alguns pesquisadores. A partir de dados fenotípicos e genotípicos, as medidas preventivas, intervencionais e de auxílio no tratamento mais adequado dos pacientes passarão a apresentar um maior potencial de sucesso.

Em maio de 2015 a OMS convocou todos os países a participarem de um plano global para a contenção da resistência antimicrobiana. Esse plano foi baseado no alarmante relatório global sobre a resistência bacteriana divulgado em 2014 (WHO, 2014b). Dessa forma, a implementação deste projeto poderá contribuir para a saúde pública no estado e do Brasil, sendo mais uma estratégia para o enfrentamento desse desafio.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Padronizar e aplicar metodologias para caracterização fenotípica e genotípica de bacilos Gram-negativos multirresistentes, pertencentes ao grupo ESKAPE isolados em hospitais de Santa Catarina, durante o período de janeiro de 2018 a janeiro de 2019.

1.1.2 Objetivos específicos

- Selecionar isolados de bacilos Gram-negativos multirresistentes do grupo ESKAPE isolados em hospitais de Santa Catarina;
- Realizar o teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA);
- Determinar o perfil de sensibilidade às polimixinas;
- Padronizar e aplicar a detecção de genes de resistência por PCR em tempo real;
- Caracterizar epidemiologicamente os isolados multirresistentes por tipagem molecular e verificar se há a presença de clones predominantes no Estado;
- Sequenciar o genoma completo e/ou os genes de resistência de isolados com perfis atípicos e/ou predominantes;
- Fornecer *feedback* metodológico e epidemiológico ao Laboratório Central de Saúde Pública/Santa Catarina (LACEN/SC) e hospitais parceiros.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE (IRAS)

As IRAS são definidas como qualquer infecção adquirida após a admissão do paciente no serviço de saúde, sendo hospital ou outra unidade prestadora de assistência à saúde, que não estavam presentes ou em incubação na admissão do paciente, podendo-se manifestar durante a internação ou após a alta e quando puder ser relacionada com a internação ou com os procedimentos hospitalares. Pode surgir da interação com os profissionais de saúde, na internação, cirurgias, procedimentos feitos em ambulatório e também cuidados domiciliares. Além disso, incluem as infecções ocupacionais adquiridas pelos profissionais de saúde. No geral, essas infecções são tratadas facilmente, porém, quando afetam pacientes vulneráveis como imunocomprometidos, com doença de base ou que passaram por procedimentos invasivos, tornam-se bastante sérias podendo ser fatais. Nesses casos, as IRAS são geralmente causadas por microrganismos resistentes a várias classes de antimicrobianos comumente utilizados no âmbito clínico (BRASIL, 1998, WHO, 2016).

As IRAS refletem uma problemática que atinge a saúde em nível mundial e são consideradas um grave problema de saúde pública, sendo os eventos adversos mais frequentes associados à assistência à saúde. Está estritamente relacionada às altas taxas de morbimortalidade, ao aumento do período de hospitalização e nos custos para o sistema de saúde. Interferem diretamente na segurança do paciente impactando na qualidade dos serviços de saúde (ANVISA, 2013b, 2016).

Segundo documento da OMS, de cada 100 pacientes hospitalizados, sete em países desenvolvidos e 10 em países em desenvolvimento irão adquirir pelo menos uma infecção relacionada à assistência à saúde. Além disso, a taxa de IRAS também é significativamente mais elevada em países de baixa e média renda em comparação com países de alta renda, principalmente em se tratando de pacientes das unidades de terapia intensiva (UTI) e em recém-nascidos. Dados semelhantes são mostrados por Padoveze e colaboradores (2014), com países em desenvolvimento apresentando uma prevalência de IRAS, podendo ser até 20 vezes superior a de países desenvolvidos (PADOVEZE, FORTALEZA, 2014, WHO, 2014b). IRAS relacionadas às UTI são uma realidade tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento, mas nestes, a frequência de infecções adquiridas nas UTI é de pelo menos 2 a 3 vezes maior do que em países desenvolvidos. Em países em desenvolvimento, 30% dos pacientes internados em UTI são afetados por pelo menos

uma IRAS. Além disso, as taxas de infecções relacionadas a dispositivos invasivos, bastante utilizados em pacientes da UTI, podem ser até 13 vezes mais altas em países em desenvolvimento (WHO, 2014b).

Os tipos de infecções mais frequentes são as de corrente sanguínea associadas a cateter central, infecção urinária também associada a cateter vesical, sítios cirúrgicos e pneumonia associada a ventilação mecânica. Em países desenvolvidos a infecção de trato urinário é a IRAS mais frequente, já em países em desenvolvimento, a infecção de sítio cirúrgico se destaca podendo afetar até um terço dos pacientes operados, valor nove vezes mais alto do que em países desenvolvidos (KHAN, BAIG, *et al.*, 2017, WHO, 2014b).

Segundo estudo feito em 2002, 1,7 milhões de infecções hospitalares ocorreram em hospitais dos EUA, tornando as IRAS a sexta maior causa de morte no país, com uma estimativa de custo de 5 a 10 bilhões de dólares anualmente. Dados semelhantes foram reportados na Europa, com 3,2 milhões de IRAS e 37 mil mortes por ano (KLEVENS, EDWARDS, *et al.*, 2007) O *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) mostra que aproximadamente 4,13 milhões de pacientes são afetados por 4,5 milhões de episódios de IRAS cada ano, tendo uma prevalência média de 7,1% (ECDC, 2008), já nos EUA a incidência foi de 4,5% (KLEVENS, EDWARDS, *et al.*, 2007, WHO, 2011). No Brasil, não há dados de mortalidade e estimativa de custos anuais em decorrência das IRAS, porém, esses dados devem ser tratados com bastante atenção, pois é provável que existam números alarmantes semelhantes ou maiores dos verificados nos EUA e nos países europeus.

No Brasil, o monitoramento nacional de indicadores de IRAS, por meio de formulários eletrônicos, foi sistematizado em 2010. Inicialmente, foram incluídas notificações obrigatórias de infecções de corrente sanguínea em pacientes com uso de cateter venoso central para todos os estabelecimentos de saúde com UTI (10 ou mais leitos) (ANVISA, 2010). Em 2014, todos os serviços de saúde com qualquer número de leitos de UTI passam a ter a obrigatoriedade de notificar mensalmente à ANVISA os dados de infecção de corrente sanguínea relacionadas com cateter venoso central em UTI, relacionando com marcadores de resistência microbiana, além da notificação de infecções de sítios cirúrgicos relacionados a cesariana (ANVISA, 2014). O Programa nacional de Prevenção de Controle de infecções Relacionadas à Assistência a Saúde (PNPCIRAS) teve sua primeira versão abrangendo o triênio 2013-2015 (ANVISA, 2013b). Na versão mais recente do PNPCIRAS (2016-2020) foram incluídos, além dos já existentes, a

notificação para os indicadores de pneumonia associada à ventilação mecânica e de infecção do trato urinário associadas à sonda vesical de demora. O PNPCIRAS tem como objetivo estabelecer metas e ações estratégicas para alcançar a redução, em âmbito nacional, da incidência de IRAS (ANVISA, 2016).

Há um consenso mundial quanto à necessidade de planos e estratégias por parte de todos os países para a redução das IRAS. Conforme ações são feitas em todo o mundo, alguns sucessos foram alcançados em relação a redução das IRAS e especialistas na área elencaram 4 pilares visando a eliminação dessas infecções: 1) promover a adesão a práticas baseadas em evidência, educando, implementando e realizando investimentos; 2) aumentar a sustentabilidade por meio de alinhamento de incentivos financeiros e reinvestimento em estratégias que demonstrarem sucesso; 3) preencher as lacunas de conhecimento para responder a ameaças emergentes por meio de pesquisas básicas, epidemiológicas e translacionais; 4) coletar dados para direcionar esforços de prevenção e mensurar os progressos (ANVISA, 2013b).

Nosso estudo abrange o pilar 3, visando estudar a epidemiologia e caracterização molecular de um grupo de bactérias no estado de Santa Catarina e alimentar o sistema com dados, que hoje são bastante escassos no estado, e assim poder direcionar para o pilar 4, utilizando esses dados para nortear as estratégias de prevenção e controle das IRAS.

Adicionalmente, outro fator complicador relacionado às IRAS é a ampla resistência bacteriana aos antimicrobianos. As IRAS, causadas por patógenos resistentes às opções terapêuticas, estão relacionadas a custos elevados na assistência, períodos prolongados de hospitalização e aumento na mortalidade (ANVISA, 2016).

2.2 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

Antimicrobianos surgiram na medicina moderna e transformaram os cuidados em saúde; são utilizados contra diversos tipos de infecções em humanos e animais, mas como acontece com qualquer medicamento, além do benefício, apresentam riscos embutidos com seu uso. Existem vários casos em que os antimicrobianos são necessários, e nesses, os benefícios superam os riscos desde que utilizados devidamente. Porém, em muitos casos, antimicrobianos são prescritos e utilizados sem necessidade e sem uma real indicação clínica, nesses casos, o paciente não terá o benefício do medicamento e será submetido desnecessariamente aos riscos. Ao utilizarmos sem necessidade, aumentamos o risco de desenvolver uma futura infecção por microrganismos

resistentes, que não respondem mais aos medicamentos utilizados usualmente (ANTÃO, VINCZE, *et al.*, 2018, CDC, 2017).

As bactérias possuem a capacidade constante de modificar o seu genoma adquirindo novos genes de resistência, dessa maneira, tornam-se cada vez mais resistentes aos antimicrobianos utilizados. Quando um antimicrobiano é utilizado na prática clínica, as bactérias suscetíveis a esse antimicrobiano são eliminadas e as resistentes sobrevivem, e essas, através da transmissão horizontal, compartilham essa resistência com várias outras bactérias. Além disso, os antimicrobianos eliminam as bactérias que fazem parte do microbiota intestinal e com isso, aumentam o risco de desenvolvimento de infecções, como por *Clostridioides difficile* e *Candida albicans*, que são as infecções mais comuns desenvolvidas por quem faz uso de antimicrobianos, principalmente por períodos longos. Dessa forma, a importância do uso consciente de antimicrobianos é ressaltada, devendo ser utilizados somente em situações nas quais realmente exista uma indicação clínica (CDC, 2017).

A resistência aos antimicrobianos têm ameaçado de forma global o tratamento de um número cada vez maior de infecções causadas por bactérias e outros microrganismos (WHO, 2014b). É considerada por muitos países como um dos mais sérios problemas de saúde pública. A multirresistência tem se tornado comum e nossa capacidade de controlar as infecções com antimicrobianos atuais está se esgotando, até mesmo infecções simples, que eram facilmente tratadas, podem tornar-se fatais. Bactérias resistentes a maior parte, ou a todos os antimicrobianos disponíveis, são isoladas rotineiramente no mundo todo, podemos dizer que entramos na era pós-antibiótica (BROWN, WRIGHT, 2016, CDC, 2017).

Dados publicados pelo CDC são alarmantes, com uma estimativa de 2 milhões de doenças e 23 mil mortes causadas por bactérias resistentes aos antimicrobianos somente nos EUA. O ECDC estimou que 700 mil mortes são associadas com resistência a antimicrobianos e dois terços dessas mortes são relacionadas com bactérias Gram-negativas (CDC, 2017, ECDC, 2011). Estudo feito por um grupo de economistas, reportou uma estimativa de mortes decorrentes da resistência aos antimicrobianos, que chamou a atenção do mundo todo. Até o ano de 2050, o número de mortes chegará a 10 milhões de pessoas com gastos de 100 trilhões de dólares, caso esforços não forem feitos para combater essa ameaça (O'NEILL, 2016).

A resistência aos antimicrobianos não ameaça somente as pessoas que adquiriram a doença infecciosa, é uma ameaça a medicina moderna, saúde global e também à indústria

veterinária e agrícola. Esse conceito que engloba todas as áreas é conhecido como: *One-Health* (ANTÃO, VINCZE, *et al.*, 2018).

Rudolf Virchow, o pai da patologia moderna, e Sir William Osler, o pai da medicina moderna, foram os primeiros a defender os conceitos de *One Health* ou *One Medicine* séculos atrás, e fizeram o primeiro elo de doenças infecciosas entre animais e humanos (CARDIFF, WARD, *et al.*, 2008, SAUNDERS, 2000). Esse conceito começou a declinar no início dos anos 1900 e voltou a ser lembrado na edição de 1984 da "Medicina Veterinária e Saúde Humana" de Calvin Schwabe, que trouxe novamente o conceito para os dias modernos. Hoje, reconhecemos que a saúde humana está ligada à saúde dos animais, assim como do ambiente que vivem e somente um esforço multidisciplinar pode alcançar a saúde para humanos e animais (ANTÃO, VINCZE, *et al.*, 2018).

Essa interação entre animais, humanos e ambiente, nos remete a outro assunto, ao uso amplo e/ou indiscriminado de antimicrobianos em humanos, animais e na agricultura, que criam condições para a mobilização de elementos de resistência entre as bactérias e é considerado como a maior pressão seletiva para emergência de bactérias MDR (DE OLIVEIRA, VAN DER SAND, 2016). O padrão cíclico de disseminação, ocorre quando pessoas usam antimicrobianos indiscriminadamente e selecionam bactérias resistentes em seu organismo. Caso venha precisar de algum serviço médico, essa pessoa acaba carregando essas bactérias para o estabelecimento de saúde e, direta ou indiretamente (principalmente pelas mãos dos profissionais de saúde), acabam contaminando outros pacientes, que carregam essas bactérias novamente para a comunidade ou podem desenvolver problemas graves de saúde. Outra forma de se iniciar o ciclo é por meio dos animais tratados com antimicrobianos, nos quais bactérias resistentes podem ser selecionadas. Posteriormente, suas fezes podem contaminar o solo e a água, que serão utilizados para o cultivo de alimentos e novamente colonizar/infectar as pessoas que irão se alimentar com a carne ou vegetais contaminados, iniciando assim um novo ciclo (ANDERSSON, HUGHES, 2011, CDC, 2013, COX, WRIGHT, 2013).

A colonização do trato gastrointestinal humano, e posterior transmissão para demais pacientes, é uma das principais fontes de bactérias Gram-negativas MDR no ambiente hospitalar e podem ser facilmente selecionadas pela terapia com antimicrobianos. Depois que os genes de resistência se tornam comuns na comunidade, uma oportunidade acaba sendo gerada para que as bactérias se tornem amplamente disseminadas através do próprio ambiente e estabeleçam um padrão cíclico de disseminação (VASOO, BARRETO, *et al.*, 2015).

Em 2013, foi publicado pelo CDC um relatório, em que as bactérias resistentes a múltiplos fármacos foram classificadas como ameaça preocupante, grave e urgente. A maioria das bactérias MDR fazem parte das bactérias Gram-negativas como as enterobactérias (*Escherichia coli*, *Klebsiella spp*, *Enterobacter spp.*), *P.aeruginosa*, *A. baumannii*, entre outras (CDC, 2013, MACVANE, 2017). No documento, também foi estimado o número mínimo de doenças e mortes causadas pela resistência aos antimicrobianos: 2,05 milhões e 23 mil, respectivamente (CDC, 2013). Os custos para a saúde, por cada caso de IRAS causada por bactérias multirresistentes, podem chegar a 85 mil dólares a mais, em comparação com a mesma situação, mas no caso de uma bactéria sensível aos antimicrobianos (MACVANE, 2017).

2.3 BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS

Bactérias Gram-negativas, como já mencionado, causam uma grande parte das infecções em humanos e animais, são responsáveis por 45-70% das pneumonias associadas à ventilação mecânica, 20-30% das infecções da corrente sanguínea relacionadas com cateter e são associadas à infecções em unidades de terapia intensiva, como infecções de sítios cirúrgicos e de trato urinário (RUPPÉ, WOERTHER, *et al.*, 2015). Esse grupo de bactérias, é composto por organismos muito bem sucedidos no ambiente, possuem a capacidade de se adaptar a uma variedade de nichos, possuem vários mecanismos intrínsecos de resistência aos antimicrobianos e têm a capacidade de adquirir novos mecanismos de resistência rapidamente (ARZANLOU, CHAI, *et al.*, 2017).

A resistência aos antimicrobianos pode se dar de 3 formas: intrínseca, adaptativa ou adquirida. Resistência intrínseca, é a expressão de propriedades inerentes de um microrganismo, como a barreira de permeabilidade da membrana externa e bombas de efluxo de drogas, que são expressas constitutivamente. A resistência adaptativa, refere-se à capacidade de se adaptar e sobreviver a várias condições de estresse, alterando rapidamente seus transcriptomas em resposta a algum estímulo ambiental, como a falta de nutrientes e presença de antimicrobianos. A resistência adquirida, ocorre quando um organismo sensível a antimicrobianos se torna resistente através da aquisição de genes ou como resultado de mutações. Um exemplo de resistência adquirida é a disseminação de plasmídeos que codificam genes para β -lactamases, permitindo a resistência a β -lactâmicos amplamente utilizados na prática clínica (BLAIR, WEBBER, *et al.*, 2015).

A resistência aos β -lactâmicos, nas bactérias Gram-negativas, é mediada principalmente pela produção de enzimas β -lactamases que hidrolisam o anel β -lactâmico inativando o

antimicrobiano. Pode-se dar também por mutações no sítio alvo do antimicrobiano, por expressão de bombas de efluxo, que removem os antimicrobianos de dentro da célula bacteriana, reduzindo a sua concentração para níveis subtóxicos e pela redução/perda de porinas da membrana externa, prevenindo a entrada dos antimicrobianos (ARZANLOU, CHAI, *et al.*, 2017, MACVANE, 2017).

As β -lactamases foram descobertas nos anos de 1940, um ano depois que a penicilina foi introduzida no mercado (GRIFFITH, RAYMOND, 2011). Até o momento, mais de 1000 β -lactamases já foram descritas, segundo o *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Para agrupar essas enzimas, foram propostos dois esquemas de classificação, a classificação de Ambler, que é baseada na identidade de sequência de aminoácidos e separa as β -lactamases em 4 grupos moleculares (A, B, C e D), e a classificação de Bush-Jacoby, que divide em 3 grupos com vários subgrupos, baseando-se em grupos funcionais de acordo com seu substrato e seu perfil de inibição, sendo esta classificação a última proposta para as β -lactamases (BUSH, 2013, BUSH, JACOBY, 2010).

Segundo Bush-Jacoby, as enzimas do grupo 1 (grupo C de Ambler) são as cefalosporinases conhecidas como AmpC, geralmente codificadas no cromossomo de muitas enterobactérias e algumas outras espécies, e são ativas contra cefalosporinas. O grupo 2 (grupo A e D de Ambler) corresponde ao maior grupo de enzimas e são chamadas de serino- β -lactamases, sendo que a maioria é inibida pelo ácido clavulânico. Dentro desse grupo temos: I) Penicilinas, um pequeno grupo que confere resistência à penicilinas (mais comum em Gram-positivos), II) β -lactamases não-ESBL que conferem resistência à penicilinas e algumas cefalosporinas, III) β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) que conferem resistência às oximino-cefalosporinas, IV) Carbapenemases do tipo KPC que conferem resistência às oximino-cefalosporinas e carbapenêmicos e V) As oxacilinas, que também podem ser carbapenemases, conferindo resistência às oxacilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos. O grupo 3 (grupo B de Ambler) que é representado pelas metalo- β -lactamases ou também conhecidas como metalo-carbapenemases, diferem-se das serino- β -lactamases pela presença de dois íons de zinco no sítio ativo, conferem resistência aos carbapenêmicos e são inibidas pelo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (Figura 1) (BUSH, JACOBY, 2010, DE OLIVEIRA, VAN DER SAND, 2016).

Figura 1. Representação esquemática das β -lactamases.

Classificação de Ambler	C Serino- β -lactamases	A Serino- β -lactamases	D Serino- β -lactamases	B Metallo- β -lactamases
Grupo Funcional	1	2	2	3
Perfil inibitório		Ácido clavulânico		EDTA
ESBLs	[Barra azul]			
Carbapenemases		[Barra rosa]		
Exemplos clássicos	Cefalosporinase: AmpC	Penicilinas Não-ESBL: TEM-1-2, SHV, GES ESBL: CTX-M, TEM-3, SHV Carbapenemases: KPC, GES	ESBL: OXA-11 Carbapenemases tipo oxacilinas: OXA-23, OXA-48	Carbapenemases: IMP, VIM, NDM, SPM

Classificação Molecular das β -lactamases segundo Ambler relacionando com o grupo funcional da classificação de Bush e Jacoby, mostrando exemplos mais comuns de cada grupo.

Fonte: Adaptado de (DE OLIVEIRA, VAN DER SAND, 2016).

As β -lactamases de espectro estendido (ESBL) são definidas como enzimas capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas de terceira geração e monobactâmicos, podendo ter pouca atividade, ou nenhuma, contra cefamicinas e carbapenêmicos. São geralmente inibidas pelo ácido clavulânico ou tazobactam. A grande maioria faz parte da classe A de Ambler, exceto pela enzima OXA-11, a qual é considerada ESBL por possuir as mesmas características de hidrólise, mas é classificada no grupo D (DE OLIVEIRA, VAN DER SAND, 2016, DOI, IOVLEVA, *et al.*, 2017).

As enzimas TEM-1, TEM-2 e SHV-1 foram descobertas antes das ESBLs, elas são citadas como β -lactamases não-ESBL, essas enzimas hidrolisam ampicilinas, mas não oximino-cefalosporinas (ceftriaxona, cefotaxima e ceftazidima) como as ESBLs. Em 1980, essas enzimas não-ESBL sofreram algumas substituições específicas de aminoácidos fazendo com que tivessem uma alteração em seu perfil e começassem a hidrolisar oximino-cefalosporinas, passando a ser ESBLs, como exemplos temos as enzimas TEM-3 e SHV (KLIEBE, NIES, *et al.*, 1985, PATERSON, BONOMO, 2005).

Outro grupo de ESBL, são as β -lactamases do grupo CTX-M, que são distintas das ESBLs do tipo TEM e SHV e foram reportadas pela primeira vez em 1989 na Alemanha (BAUERNFEIND, SCHWEIGHART, *et al.*, 1990). Nos anos 90, essas enzimas foram bastante reportadas e consideradas as ESBL mais frequentes, ultrapassando as ESBLs do tipo TEM e SHV. As CTX-M são classificadas em 6 grupos distintos: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25 e KLUC, cada grupo difere em 10% ou mais na identidade da sequência de

aminoácidos (D'ANDREA, ARENA, *et al.*, 2013). O gene que codifica para essas enzimas foi originado do cromossoma de espécies do gênero *Kluyvera*, que pertence à família Enterobacteriaceae, mas que raramente causam infecções em humanos. Ao contrário das ESBLs TEM e SHV, as CTX-M hidrolisam preferencialmente cefotaxima do que ceftazidima (DOI, IOVLEVA, *et al.*, 2017). A CTX-M-15 que pertence ao grupo CTX-M-1, é a mais encontrada em humanos no mundo todo, seguida da CTX-M-14 que pertence ao grupo CTX-M-9 (BEVAN, JONES, *et al.*, 2017). Em estudo realizado em um hospital de Florianópolis/SC, mostrou que entre as ESBLs, a mais prevalente foi a do tipo TEM, seguida de CTX-M do grupo 1 (ZAMPARETE, 2014).

Carbapenemases são as enzimas mais preocupantes entre as β -lactamases, pois possuem a capacidade de hidrolisar os carbapenêmicos, uma das últimas alternativas para o tratamento de infecções por Gram-negativos (POTTER, D'SOUZA, *et al.*, 2016). KPC é a carbapenemase mais disseminada no mundo e confere resistência às cefalosporinas de amplo espectro e aos carbapenêmicos (NORDMANN, POIREL, 2014, PEREIRA, DE ARAUJO, *et al.*, 2013). Em 1996, foi encontrada nos EUA o primeiro isolado de KPC. A primeira encontrada no Brasil, foi em 2006, e desde então, é considerada endêmica no mundo todo (MONTEIRO, SANTOS, *et al.*, 2009, YIGIT, QUEENAN, *et al.*, 2001).

Entre as metalo- β -lactamases, as famílias mais comuns são IMP, VIM, SPM e a mais recente e emergente *New Delhi metallo- β -lactamase* (NDM), que preocupa pela sua rápida disseminação entre diferentes espécies. O primeiro isolado foi encontrado na Índia em 2009, três anos depois, em 2012, foi detectada a primeira NDM no Brasil em Joinville/SC (DEGLMANN, KOBBS, *et al.*, 2019, ROZALES, RIBEIRO, *et al.*, 2014, YONG, TOLEMAN, *et al.*, 2009).

As oxacilinasas hidrolisantes de carbapenêmicos (OXA), possuem menor capacidade de hidrólise dos carbapenêmicos, porém quando superexpressas ou associadas com outros fatores de resistência, podem aumentar essa capacidade. São amplamente encontradas em *Acinetobacter* spp., principalmente a OXA-23 e OXA-51. Já a OXA-48 e seus derivados, são encontradas na família Enterobacteriaceae (NORDMANN, POIREL, 2014, POIREL, NAAS, *et al.*, 2010).

Recentemente, o gene *mcr-1* mediado por plasmídeos, vem sendo detectado em várias partes do mundo, ele confere resistência ao antimicrobiano mais utilizado atualmente que está disponível para tratamento de bactérias resistentes aos carbapenêmicos, as polimixinas. O primeiro relato, foi em 2015 na China, em amostras de porcos. Desde então, já foi relatado em vários países

em amostras de animais e humanos. O mecanismo de resistência do gene *mcr-1*, é a enzima fosfatidiletanolamina transferase, que tem a capacidade de modificar a membrana celular da bactéria, transferindo um resíduo de fosfoetanolamina para o lipídeo A, presente na membrana. Com essa alteração, a bactéria diminui consideravelmente a sua afinidade pelas polimixinas, resultando na redução da atividade deste antimicrobiano. Esse tipo de resistência é conhecido como modificação do sítio alvo (LIU, WANG, *et al.*, 2016). Estudos demonstram que esse gene pode estar se espalhando silenciosamente no Brasil, pois quando pesquisado, é feito somente em amostras resistentes à polimixina. Entretanto, o gene *mcr-1*, já foi encontrado em isolados sensíveis à polimixina, podendo apresentar resistência a qualquer momento por pressão seletiva (FERNANDES, MOURA, *et al.*, 2016).

Diante da ameaça crescente da resistência aos antimicrobianos, governos do mundo todo estão se mobilizando para manejar esse grave problema que ameaça a medicina moderna. A era pós-antibiótica, citada anteriormente, em que infecções comuns e ferimentos pequenos podem levar a morte, não está longe de acontecer, e é uma possibilidade bastante real para o século 21 (WHO, 2014).

2.4 BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS DO GRUPO ESKAPE

Como já mencionado anteriormente, as bactérias Gram-negativas são consideradas um dos maiores problemas em relação à resistência aos antimicrobianos. Sua incidência é alarmante, sendo considerada uma questão urgente pelo CDC (CDC, 2013).

A OMS, em 2017, publicou uma lista global de patógenos prioritários composta por bactérias resistentes a antimicrobianos. Teve como propósito, ajudar na priorização da pesquisa e no desenvolvimento de novos e eficazes tratamentos com antimicrobianos. Nessa lista, as bactérias foram divididas entre prioridade crítica, alta e média. As bactérias Gram-negativas pertencentes ao grupo ESKAPE, são listadas como bactérias resistentes com prioridade crítica na pesquisa (WHO, 2017).

Em 2008, o termo ESKAPE foi mencionado pela primeira vez. Foi utilizado para agrupar algumas bactérias que estavam causando um aumento significativo de IRAS, e tinham a capacidade de “escapar” (do inglês *escape*) dos efeitos dos antimicrobianos, desenvolvendo altos níveis de resistência (RICE, 2008). O grupo ESKAPE é composto pelas bactérias: *Enterococcus* spp. e *Staphylococcus aureus* (Gram-positivos), *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*,

Pseudomonas aeruginosa e *Enterobacter* spp. (Gram-negativos) (FOUNOU, FOUNOU, *et al.*, 2018, RAMSAMY, ESSACK, *et al.*, 2018).

Dos seis patógenos pertencentes ao grupo ESKAPE, quatro são bactérias Gram-negativas, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, e *Enterobacter* spp., e têm sido associadas com os quatro maiores tipos de multidroga resistência: ESBL produzidas por *K. pneumoniae* e *Enterobacter* spp., carbapenemases produzidas por *A. baumannii* e metalo- β -lactamases em *P. aeruginosa*. (FOUNOU, FOUNOU, *et al.*, 2018).

K. pneumoniae e *Enterobacter* spp., fazem parte da família Enterobacteriaceae, que é composta por diversas bactérias Gram-negativas. Além dessas duas, pertencentes ao grupo ESKAPE, há também *E. coli* e *Proteus* spp. (VASOO, BARRETO, *et al.*, 2015). As enterobactérias fazem parte da microbiota intestinal anfiôntica e indivíduos podem ser colonizados de forma assintomática por elas, funcionando como um reservatório desses microrganismos. Dessa forma, podem espalhar essas bactérias para outras pessoas, principalmente para pacientes hospitalizados que estão imunocomprometidos, e uma parte desses pacientes, irá desenvolver infecções devido à estas bactérias (SNITKIN, ZELAZNY, *et al.*, 2012).

Dados de vigilância epidemiológica, demonstram um aumento constante de doenças causadas por enterobactérias multirresistentes, principalmente aos carbapenêmicos, conhecidas como CRE (*Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae*) (BANERJEE, HUMPHRIES, 2017). β -lactamases do tipo AmpC, ESBL, produção de carbapenemases como as serino- β -lactamases (ex: KPC, GES) e metalo- β -lactamases (ex: NDM, IMP, VIM), conferem um fenótipo de MDR em enterobactérias.

Em 2018, foi publicado um boletim epidemiológico feito pela secretaria de Estado de Saúde de Santa Catarina (Coordenação Estadual de Controle de Infecção em Serviços de Saúde – CECISS), analisando os anos de 2014 a 2017. Essa publicação avaliou os microrganismos relacionados à IRAS, especificamente em infecções de corrente sanguínea nas UTIs. Ao todo, são 61 hospitais com leitos de UTI no estado (UTI adulto, pediátrica e neonatal). A espécie *K. pneumoniae* aparece em terceiro lugar, com 13,7%, entre os principais microrganismos causadores de infecção sanguínea nas UTIs adulto e neonatal (CECISS, 2018).

Acinetobacter spp. é um bacilo Gram-negativo, não fermentador da glicose. É considerado um patógeno oportunista, inicialmente considerado de baixo potencial patogênico em indivíduos saudáveis. É conhecido por causar IRAS em pacientes imunocomprometidos, apresentando altas

taxas de morbidade e mortalidade (ABBOTT, I, CERQUEIRA, *et al.*, 2013, D., X., *et al.*, 2015, SKARIYACHAN, TASKEEN, *et al.*, 2019). É considerado um dos patógenos mais emergentes em infecções hospitalares devido sua capacidade em desenvolver resistência à maioria dos antimicrobianos usados na clínica médica (SKARIYACHAN, TASKEEN, *et al.*, 2019).

Possui resistência intrínseca a vários antimicrobianos e o mecanismo mais comum de resistência aos carbapenêmicos é a degradação enzimática por carbapenemases, especialmente as metalo- β -lactamases e as oxacilinases (ABBOTT, I, CERQUEIRA, *et al.*, 2013, LEE, J, PARK, *et al.*, 2016). A propagação clonal de carbapenemases, principalmente do tipo OXA, tem ocorrido dentro de vários hospitais, bem como a disseminação inter-hospitalar, sendo observada em vários países (KUO, YANG, *et al.*, 2010). Essa espécie, possui a capacidade de sobreviver em ambientes úmidos e secos por longos períodos. Sobrevive em alimentos e em pele saudáveis, como por exemplo, nas mãos de manipuladores de alimentos e profissionais da saúde (ABBOTT, Iain, CERQUEIRA, *et al.*, 2013, KEMPF, ROLAIN, 2012, PELEG, SEIFERT, *et al.*, 2008). Outra característica, que favorece a colonização e a infecção dos pacientes, é a formação de biofilme, que facilita a adesão da bactéria aos dispositivos médicos implantáveis, como cateteres e tubos de ventilação mecânica (LEE, C, LEE, *et al.*, 2017, LEE, H.-W., KOH, *et al.*, 2008).

Pseudomonas spp. é outro microrganismo representante dos bacilos Gram-negativos, não-fermentadores da glicose, e também está entre as principais causas de infecções hospitalares. É resistente à maioria dos antimicrobianos utilizados, e tem uma propensão em desenvolver resistência durante a terapia com antimicrobianos, principalmente com carbapenêmicos (LAMERS, BURROWS, 2016, SANTAJIT, INDRAWATTANA, 2016). Nessa espécie, o mecanismo mais comum de resistência aos carbapenêmicos, é a combinação de uma AmpC, que codifica para uma enzima capaz de quebrar o anel β -lactâmico, juntamente com uma mudança na expressão de porinas e uma superexpressão de bombas de efluxo, levando a altos níveis de resistência aos carbapenêmicos. Também podem produzir ESBL, enzimas como a KPC e metalo- β -lactamases como IMP, VIM e SPM (PANG, RAUDONIS, *et al.*, 2019, PASTOR-SATORRAS, VESPIGNANI, 2000).

Uma revisão sistemática feita com estudos publicados nos anos de 2000 a 2016, mostrou que a mortalidade é associada diretamente com a resistência bacteriana, baseado em dados estatisticamente significantes. Revelou também, que patógenos do grupo ESKAPE, foram associados com alto risco de mortalidade. Os autores citam também, alguns esforços para ajudar

os países em desenvolvimento, como implementação de medidas de prevenção, infecção e controle, programas de manejos e uso racional de antimicrobianos, em ambientes hospitalares e comunitários, diagnósticos rápidos, investimento em novos antimicrobianos e uma plataforma internacional para vigilância e monitoramento global da resistência antimicrobiana. Para, dessa forma, poder auxiliar a contenção dessa ameaça (FOUNOU, FOUNOU, *et al.*, 2017).

Com todos esses mecanismos de resistência citados, que são encontrados em bactérias consideradas mundialmente como ameaças urgentes, a pesquisa epidemiológica dos genes de resistência circulantes, é fundamental para o conhecimento dos dados existentes no estado de Santa Catarina. As ferramentas moleculares, são uma forma de ajudar a elucidar a problemática atual, sendo essencial para o conhecimento e rastreamento dessas resistências.

2.5 TÉCNICAS MOLECULARES E FENOTÍPICAS

As técnicas moleculares para detecção genotípica de determinantes de resistência, são consideradas o padrão-ouro para detecção de genes de resistência. Apesar das técnicas fenotípicas serem bastante utilizadas e fornecerem bons resultados para a clínica, as técnicas moleculares fornecem mais informações e com uma maior acurácia (ASHKENAZI HOFFNUNG, BURDELOVA, *et al.*, 2017). A PCR em tempo real usada de forma qualitativa, é uma ferramenta bastante empregada para detecção de genes de resistência. Sua vantagem em comparação com a técnica tradicional de ponto final é a possibilidade de visualizar os resultados em tempo real, sem a necessidade da utilização de gel, além da maior sensibilidade da técnica. Para essa técnica, podem ser usadas sondas de hidrólise ou intercalantes de DNA (THORNTON, BASU, 2015).

Os métodos de genotipagem são capazes de distinguir isolados bacterianos diferentes dentro de uma mesma espécie, sendo uma ferramenta epidemiológica essencial no controle e prevenção de infecções. A genotipagem bacteriana pode ser utilizada para elucidar as fontes e vias de propagação de bactérias, a fim de identificar isolados patogênicos emergentes ou clones pertencentes a um surto dentro de uma mesma instituição ou em instituições diferentes (MARKS, KROUPA, 2011, SABAT, BUDIMIR, *et al.*, 2013).

A eletroforese de campo pulsado, conhecida como *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE), foi considerada por muito tempo como padrão-ouro entre os métodos de tipagem molecular. Essa técnica utiliza enzimas de restrição de corte raro com posterior eletroforese de campo pulsado para separação dos fragmentos. A partir do padrão de eletroforese, cada amostra é

identificada com um número de genótipo, o qual é utilizado para a comparação com as demais para avaliação da similaridade. A principal vantagem do método, é a abordagem de uma grande parte do genoma que está sendo investigado (>90%) (DURMAZ, OTLU, *et al.*, 2009, FOXMAN, ZHANG, *et al.*, 2005).

Durante os últimos anos, o sequenciamento do genoma completo (WGS, do inglês *whole genome sequencing*) tem emergido como ferramenta para auxiliar em investigações de surtos, para elucidar perfis de resistência aos antimicrobianos e para detecção de novas mutações. O sequenciamento completo produz resultados com alta resolução e grande poder discriminatório, capaz de auxiliar no controle das infecções. Os métodos de tipagem disponíveis, apesar de serem muito úteis, não fornecem uma resolução suficiente em isolados estreitamente relacionados, dentro de um estabelecimento de saúde. O sequenciamento de isolados identificados como clones ou intimamente relacionados pode facilitar o entendimento da disseminação desses agentes (MARTINEZ, BUSTAMANTE, *et al.*, 2016, PADOVEZE, FORTALEZA, 2014, SNITKIN, ZELAZNY, *et al.*, 2012). Com o sequenciamento também é possível detectar os grupos de incompatibilidade de plasmídeos, que podem ser associados aos genes de resistência encontrados na amostra. Essa associação, do grupo de incompatibilidade com um gene de resistência, pode afirmar que este gene está inserido em um plasmídeo e não está cromossomicamente codificado. A incompatibilidade é a incapacidade dos plasmídeos, que compartilham os mesmos sistemas de partição e replicação, de serem propagados de forma estável na mesma célula hospedeira. Essa classificação é baseada na sequência de aminoácidos que compõe a proteína de iniciação da replicação (Rep) (SHINTANI, SANCHEZ, *et al.*, 2015).

O ECDC recomenda o sequenciamento de genoma completo como método primário de genotipagem na vigilância em saúde pública. O WGS tornou-se o método de tipagem microbiana de referência em estudos de surtos e é cada vez mais aplicado à vigilância nacional de doenças infecciosas. Possui uma melhor precisão e eficácia na vigilância de doenças, investigação de surtos e auxilia nas políticas de prevenção por meio de uma avaliação da transmissão de doenças e resistência a medicamentos (ECDC, 2016). Reforçando essa ideia, em 2019, o ECDC propõe priorizar a implementação do WGS, dependendo da doença e da aplicação na saúde pública, listando uma proposta de patógenos/doenças prioritárias e opções para implementação da técnica em médio prazo (2019 a 2021). Entre todos os patógenos listados, temos as enterobactérias

resistentes aos carbapenêmicos e polimixinas e *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos (ECDC, 2019).

Perante o exposto, o conhecimento da epidemiologia local, através de uma avaliação genotípica das bactérias que circulam nos estabelecimentos de saúde, por meio da detecção precisa e precoce dos isolados multirresistentes, é essencial para rastrear a distribuição destes isolados e, com isso, evitar a disseminação de surtos e auxiliar na conduta dos tratamentos em pacientes infectados por bactérias multirresistentes. A utilização de ferramentas moleculares, para elucidação da problemática atual das IRAS, que são associadas aos processos infecciosos causados por esses microrganismos, torna-se crucial para diminuir as taxas de morbimortalidade.

3 METODOLOGIA

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC (CAAE: 53562716.4.3001.0115) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Estadual de Saúde (Case: 53562716.4.0000.0121; nº: 1.450.706, aprovado em 14/03/2016). Foi solicitada a Dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), pois não foram utilizados dados que levem à identificação do paciente, somente dados relativos à bactéria isolada do paciente que foram utilizados no projeto.

3.2 HOSPITAIS

Foram utilizados isolados de hospitais públicos ou sem fins lucrativos de várias cidades do estado, para se obter uma ampla distribuição geográfica. Compreendendo as regiões sul, central, vale do Itajaí, norte e oeste. Os nomes dos hospitais não foram revelados, para preservar as instituições, conforme pedido do LACEN/SC. Dessa forma, os isolados bacterianos foram divididos em 5 regiões (1, 2, 3, 4 e 5) e cada região, com seus respectivos hospitais nomeados com letras (A, B e C). Sendo que algumas regiões, possuem menos hospitais do que outras.

Os hospitais do estado já seguem um protocolo de envio de bactérias resistentes para o LACEN/SC, dessa forma, os isolados são fornecidos diretamente pelo LACEN/SC, não tendo contato com os hospitais participantes.

Para atender ao projeto, foi criado um protocolo de envio de bactérias Gram-negativas para o LACEN/SC, segundo Nota Técnica de 2016 (LACEN/CECISS, 2016), seguindo a seguinte estratégia:

a) Aqueles hospitais que não fazem o teste recomendado pela nota técnica da Anvisa (ANVISA, 2013a), que utiliza bloqueadores enzimáticos para detecção fenotípica de carbapenemases em enterobactérias, enviaram todas as bactérias resistentes ou com resistência intermediária aos carbapenêmicos (imipenem, meropenem e ertapenem);

b) Aqueles hospitais que realizam o teste, enviaram qualquer isolado de enterobactéria que teve resultado inconclusivo com o teste;

c) Foram enviadas bactérias não fermentadoras da glicose (*Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp.) resistentes e/ou com resistência intermediária aos carbapenêmicos e/ou polimixinas.

d) Foram encaminhados ao LACEN/SC somente os isolados de culturas de bactérias provenientes de amostras clínicas (não foram encaminhadas culturas de bactérias provenientes de *swab* de vigilância).

O presente projeto de doutorado fez parte de um projeto maior, em que foram avaliadas bactérias Gram-positivas e negativas. Para este trabalho, foram utilizadas somente bactérias Gram-negativas, MDR e pertencentes ao grupo ESKAPE (*K. pneumoniae*, *Enterobacter spp.* *P. aeruginosa* e *A. baumannii*), provenientes de amostras clínicas isoladas de janeiro de 2018 a janeiro de 2019.

3.3 ISOLADOS BACTERIANOS

3.3.1 Processamento dos isolados no LACEN/SC

Ao chegar no LACEN/SC, os isolados foram identificados novamente para confirmação da espécie. Foram realizados os testes de sensibilidade aos carbapenêmicos (meropenem, imipenem e ertapenem) e o teste fenotípico de inibição enzimática para as enterobactérias, que é preconizado pela ANVISA (ANVISA, 2013a). Posteriormente, os isolados foram armazenados na bacterioteca da instituição. As enterobactérias com resistência aos carbapenêmicos que não tiveram um resultado conclusivo com o teste da ANVISA foram enviadas para o LACEN do estado do Paraná (LACEN/PR) para detecção de genes de resistência que não é feita no LACEN/SC. Como já mencionado em um dos objetivos específicos, as metodologias padronizadas foram repassadas para o LACEN/SC, para que a instituição possa implementar futuramente a caracterização genotípica sem a necessidade de enviar os isolados para Curitiba. Para as bactérias Gram-negativas não fermentadoras da glicose, todos os isolados resistentes aos carbapenêmicos foram enviadas para o LACEN/PR para detecção genotípica de genes de resistência.

O LACEN/SC recebe uma média de 150 isolados por mês de bacilos Gram-negativos de todo o estado, com uma média de 84 isolados de Gram-negativos do grupo ESKAPE. Considerando-se uma coleta de 13 meses, de janeiro de 2018 a janeiro de 2019, para que o número de amostras não fosse muito elevado, foram escolhidos para este projeto: três isolados por hospital, de cada região, priorizando-se bactérias resistentes aos carbapenêmicos com testes fenotípicos inconclusivos. Respeitando esses critérios, as amostras foram escolhidas aleatoriamente pelo LACEN/SC.

3.3.2 Processamento dos isolados no Laboratório MIMA/UFSC

A seleção dos isolados que foram entregues para o projeto foi feita conforme o LACEN/SC recebia os resultados mensais dos isolados enviadas para o LACEN/PR. As bactérias foram entregues em placa de ágar nutriente com crescimento de 24 horas, feitas a partir da bacterioteca do LACEN/SC. Para aquelas que não obtiveram sucesso no crescimento, os tubos com ágar nutriente inclinado, da bacterioteca do LACEN/SC, foram entregues para tentativa de recuperação no laboratório de Microbiologia Molecular Aplicada (MIMA/UFSC). Além das amostras nomeadas por região e por hospital, o resultado dos testes de sensibilidade aos carbapenêmicos também foram entregues para este projeto.

Ao chegar no laboratório MIMA/UFSC os isolados foram semeados em ágar MacConkey (KASVI[®]), que é um ágar seletivo para bactérias Gram-negativas, para visualização da morfologia das colônias e para verificar se a cultura continha somente um tipo de bactéria. Para aquelas bactérias que a morfologia não estava compatível com a espécie informada pelo LACEN, foram realizados alguns testes bioquímicos em tubo para confirmação da espécie. Aquelas que não cresceram em MacConkey foram substituídas por nova amostra.

A partir da placa de MacConkey os isolados foram nomeados e estocados a -20°C, em duplicata. Para isso, foram utilizados microtubos contendo caldo *brain heart infusion* (BHI; Sigma Aldrich[®]) com 20% de glicerol. A partir desse estoque foram realizadas todas as metodologias do projeto.

3.4 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS (TSA)

O teste de sensibilidade aos antimicrobianos foi realizado para todos os 153 isolados bacterianos. Para a determinação do TSA foi utilizado o teste de disco-difusão em ágar, seguindo todas as recomendações do manual do *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (BrCAST) (BRCAST, 2017) para o preparo e armazenamento dos meios de cultura, preparação do inóculo, inoculação dos discos de antimicrobianos, incubação, aferição e interpretação dos halos. Para determinação dos diâmetros dos halos e concentração dos discos de antimicrobianos escolhidos, nas bactérias não-fermentadoras (*A. baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*), foi utilizado as recomendações do CLSI (CLSI, 2020) e para as enterobactérias (*K. pneumoniae* e *Enterobacter* spp.), as do BrCAST (BRCAST, 2020).

Para a realização da disco-difusão as bactérias provenientes de culturas puras e frescas (máximo de 24 horas), foram suspensas em salina estéril 0,9% para obtenção da escala 0,5 de McFarland, utilizando o aparelho DensiCHEK™ Plus (Biomerieux). Com auxílio de um *swab* estéril, a suspensão de bactérias foi semeada em placas de ágar Mueller Hinton (Kasvi) em 3 direções, para que a placa ficasse homogênea. Em seguida, com auxílio do aplicador de discos Disk Dispenser (Bio-rad), os discos dos antimicrobianos foram depositados nas placas. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 18 a 22 horas. Após incubação, os halos foram aferidos com auxílio de uma régua e interpretados como sensível (S), sensível aumentando a exposição (I) e resistente (R), para cada um dos antibióticos testados.

O teste de sinergismo de disco duplo foi realizado em todas as enterobactérias para detecção da produção de ESBL. Para realização desse teste, discos contendo cefalosporinas (cefotaxima, ceftazidima, cefepima) e aztreonam foram aplicados à placa, ao redor de um disco com ácido clavulânico (amoxicilina-ácido clavulânico), respeitando-se a distância de 20 milímetros de centro a centro entre os discos. Um resultado positivo foi indicado quando as zonas de inibição em torno de qualquer um dos discos, de cefalosporinas e aztreonam, foram aumentadas ou distorcidas na direção do disco que contém o ácido clavulânico, formando assim a “zona fantasma”.

Os antimicrobianos (Bio-rad) utilizados, as bactérias testadas e a concentração dos discos estão representadas no Quadro 1.

Quadro 1. Antimicrobianos utilizados e bactérias testadas.

Classe	Antimicrobiano	Concentração (μg)	Bactérias testadas
Penicilinas + inibidor	Amoxicilina/Ácido clavulânico	20/10	Enterobactérias*
	Ampicilina/Sulbactam	10/10	Enterobactérias <i>A. baumannii</i> <i>P. aeruginosa</i>
	Piperacilina/Tazobactam	30/6	Enterobactérias
	Piperacilina/Tazobactam	100/10	<i>A. baumannii</i>
Cefalosporinas	Cefalexina	30	Enterobactérias
	Cefuroxima	30	Enterobactérias
	Cefoxitina	30	Enterobactérias*
	Cefotaxima	5	Enterobactérias
	Cefotaxima	30	<i>A. baumannii</i>
	Ceftriaxona	30	Enterobactérias <i>A. baumannii</i>
	Ceftazidima	10	Enterobactérias

	Ceftazidima	30	<i>A. baumannii</i> , <i>P. aeruginosa</i>
	Cefepime	30	Enterobactérias <i>A. baumannii</i> , <i>P. aeruginosa</i>
Carbapenêmicos	Meropenem	10	Enterobactérias <i>A. baumannii</i> <i>P. aeruginosa</i>
	Imipenem	10	Enterobactérias <i>A. baumannii</i> <i>P. aeruginosa</i>
	Ertapenem	10	Enterobactérias
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacino	5	Enterobactérias <i>A. baumannii</i> <i>P. aeruginosa</i>
	Levofloxacino	5	Enterobactérias <i>A. baumannii</i> <i>P. aeruginosa</i>
	Norfloxacino	10	Enterobactérias <i>P. aeruginosa</i>
	Ácido nalidíxico	30	Enterobactérias
Aminoglicosídeos	Tobramicina	10	Enterobactérias <i>A. baumannii</i> <i>P. aeruginosa</i>
	Gentamicina	10	Enterobactérias <i>A. baumannii</i> <i>P. aeruginosa</i>
	Amicacina	30	Enterobactérias <i>A. baumannii</i> <i>P. aeruginosa</i>
Monobactâmico	Aztreonam	30	Enterobactérias <i>P. aeruginosa</i>
Tetraciclina	Tetraciclina	30	<i>A. baumannii</i>
Outros	Sulfametoxazol/Trimetoprim	23,75/1,25	Enterobactérias <i>A. baumannii</i>
	Nitrofurantoína	100	Enterobactérias

* Exceto *Enterobacter* spp. que possui resistência intrínseca. Fonte: autora.

3.5 DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE ÀS POLIMIXINAS

3.5.1 Disco-eluição em caldo

Para determinar a sensibilidade dos isolados às polimixinas foi realizada uma triagem das amostras utilizando o teste de eluição do disco da colistina (do inglês *colistin broth disk elution*)

(SIMNER, BERGMAN, *et al.*, 2018). No método de disco-eluição em caldo, 0, 1, 2 e 4 discos de polimixina E (colistina; Oxoid®, 10 µg) foram adicionados em 4 diferentes tubos contendo 10 mL de caldo Mueller-Hinton cátion-ajustado (Sigma-Aldrich). Os tubos foram incubados em temperatura ambiente por 30 minutos, para dissolução do antimicrobiano dos discos. Cada um dos 4 tubos ficou com uma concentração de colistina de 0, 1, 2 e 4 µg/mL, respectivamente. Em seguida, uma suspensão em salina estéril 0,9%, na escala 0,5 de McFarland (DensiCHEK™ Plus-Biomerieux), foi feita a partir de culturas puras de cada bactéria. A partir dessa suspensão, uma alíquota de 50 µL foi adicionada em cada um dos 4 tubos. Os tubos foram homogeneizados utilizando *vortex* e incubados por 16 a 20 horas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ em estufa bacteriológica. A leitura foi feita visualmente pela percepção da turvação do meio. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo último tubo em que não houve presença de turvação.

Uma bactéria foi considerada resistente à colistina quando a CIM foi $> 2 \text{ mg/L}$, conforme manual do BrCAST e CLSI.

3.5.2 Microdiluição em caldo

Para as bactérias que tiveram uma $\text{CIM} \geq 2 \text{ mg/L}$ no teste de disco-diluição, o teste de microdiluição em caldo foi realizado para polimixina E (colistina) e para polimixina B (ambas da Sigma-Aldrich, EUA). O teste seguiu todas as recomendações do CLSI (CLSI, 2020).

Para esse teste, foram utilizadas placas de cultura estéreis de 96 poços com fundo em formato de “U”, para melhor visualização do resultado. Primeiramente, 100 µL de caldo Mueller Hinton cátion-ajustado concentrado 2X, com pH de $7,4 \pm 0,2$ (Sigma-Aldrich, EUA) foi adicionado em todos os poços da placa de cultura. Em seguida, o antimicrobiano diluído foi adicionado nos poços, com exceção do controle positivo de crescimento dos isolados. A concentração do antimicrobiano foi preparada de modo que, ao se colocar na placa, ficasse com concentrações superiores e inferiores ao ponto de corte estabelecido pelo CLSI, conforme indicado na Figura 2.

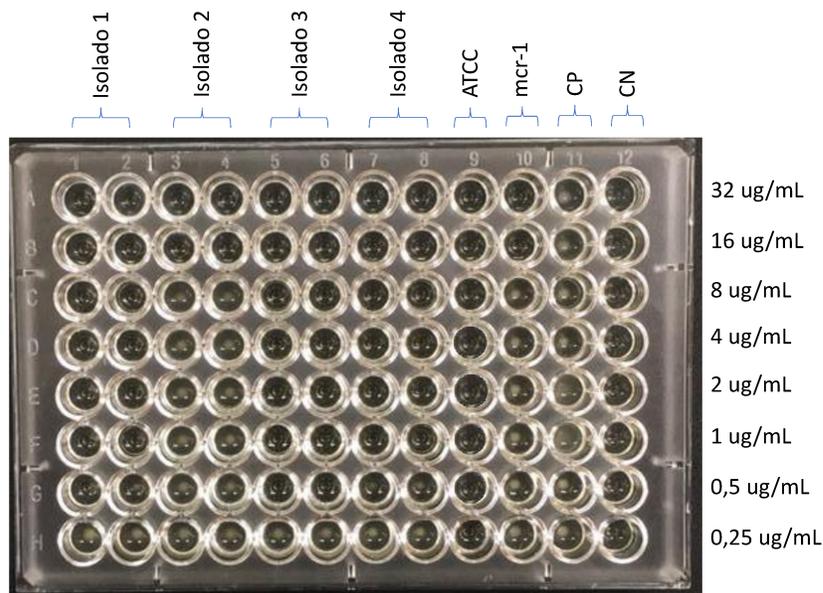
Em seguida, foi preparado o inóculo bacteriano em salina estéril 0,9%, a partir de culturas frescas (máximo de 24 horas). O inóculo foi feito na escala 0,5 McFarland com auxílio do aparelho DensiCHECK™ Plus (Biomerieux). Essa suspensão foi diluída 1:10 para que ficasse com uma concentração de aproximadamente 10^7 unidades formadoras de colônia (UFC)/mL, então, foram adicionados 5 µL dessa diluição, em duplicata, à placa contendo o meio de cultura e o

antimicrobiano. A concentração final das células foi de 5×10^4 UFC/poço. Cada placa foi possível testar 4 isolados diferentes em duplicata.

O controle de qualidade dos testes foi feito adicionando aos ensaios uma cepa controle sensível às polimixinas (*E. coli* ATCC 25922) e um isolado resistente (*E. coli* com gene *mcr-1*).

Um isolado é considerado resistente às polimixinas quando CIM > 2 µg/mL. A análise dos resultados foi realizada visualmente observando-se botões de turvação no fundo do poço da placa, significando um crescimento bacteriano. Na Figura 2, pode-se verificar exemplos de amostras resistentes e sensíveis.

Figura 2. Placa representativa de microdiluição em caldo para polimixina.



O isolado 2 foi resistente a polimixina apresentando um crescimento bacteriano até a concentração de 8 µg/mL, tendo uma CIM de 16 µg/mL. Os outros isolados, 1, 3 e 4, foram sensíveis a polimixina com CIM de 0,5, 0,5 e 1 µg/mL, respectivamente. A ATCC foi sensível, como esperado, e a *E. coli mcr-1* foi resistente com CIM de 16 µg/mL. O controle positivo apresentou crescimento e controle negativo do meio de cultura, sem crescimento.

CP: controle positivo dos isolados testados (sem antimicrobiano); CN: controle negativo (sem bactérias) somente com meio de cultura e antimicrobiano. Fonte: elaborado pela autora.

3.6 DETECÇÃO MOLECULAR DE GENES DE RESISTÊNCIA

A detecção dos genes de resistência associados a ESBL, carbapenemases, metalo-β-lactamases e *mcr-1* foi feito pela técnica de PCR em tempo real utilizada de forma qualitativa. Para

cada bactéria foram selecionados os principais genes de resistência encontrados na literatura. Os genes detectados para cada bactéria estão demonstrados no Quadro 2.

Quadro 2. Genes de resistência selecionados para cada bactéria.

Genes de resistências	Bactérias Gram-negativas do grupo ESKAPE			
	<i>K. pneumoniae</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>Enterobacter spp.</i>
<i>bla</i> _{TEM}	X	X	X	x
<i>bla</i> _{SHV}	X	X	X	X
<i>bla</i> _{CTX-M1}	X	X	X	X
<i>bla</i> _{CTX-M2}	X	X	X	X
<i>bla</i> _{CTX-M8}	X	X	X	X
<i>bla</i> _{CTX-M9}	X	X	X	X
<i>bla</i> _{GES}	X	X	X	X
<i>bla</i> _{KPC}	X	X	X	X
<i>bla</i> _{IMP}	X	X	X	X
<i>bla</i> _{VIM}	X	X	X	X
<i>bla</i> _{NDM}	X	X	X	X
<i>bla</i> _{SPM}		X	X	
<i>bla</i> _{OXA-48}	X	X	X	X
<i>bla</i> _{OXA-23}		X		
<i>bla</i> _{OXA-51}		X		
<i>bla</i> _{OXA-24}		X		
<i>bla</i> _{OXA-143}		X		
<i>bla</i> _{OXA-58}		X		
<i>mcr-1</i>	X	X	X	X

Fonte: elaborado pela autora.

3.6.1 Desenho dos iniciadores para a PCR

Os iniciadores utilizados nas reações de PCR em tempo real foram desenhados pelo grupo de pesquisa do Laboratório MIMA, com exceção de 2 pares [*bla*_{OXA-24} (YANG, RUI, 2016) e *bla*_{OXA-143} (HIGGINS, LEHMANN, *et al.*, 2010)]. Foram padronizados quanto a sua funcionalidade

em PCR de ponto final e verificação da formação de banda dos produtos de interesse, através de eletroforese em gel. Para o desenho dos iniciadores foi utilizado o programa *Primer Select* versão 3.0.25 (Lasergene, DNA Star) e posteriormente, cada iniciador foi avaliado utilizando a base PrimerBlast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) para verificar a sua especificidade.

Foram sintetizados 19 iniciadores, sendo eles: *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} grupos 1, 2, 8 e 9, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{GES}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA24}, *bla*_{OXA-58}, *bla*_{OXA-143}, *bla*_{SPM} e *mcr-1* (Quadro 3). Toda a padronização foi feita com controles positivos de cada gene, mostrados no Quadro 4.

Quadro 3. Iniciadores e genes amplificados.

Genes	Sequência dos iniciadores (5'-3')		Tamanho do produto (pb)	Variantes gênicas amplificadas
<i>bla</i> _{TEM}	F	GTTGGGAACCGGAGCTGAATGAA	231	TEM-1, 2, 12, 17, 26, 30, 32, 33, 34, 35, 40, 45, 53, 54, 55, 57, 60, 63, 67, 70, 76, 77, 79, 80, 81, 83, 84, 87, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 104, 105, 106, 110, 116, 122, 124, 126, 127, 128, 129, 133, 135, 141, 143, 145, 146, 148, 150, 153, 154, 156, 157, 158, 159, 160, 162, 163, 164, 166, 168, 171, 176, 183, 184, 186, 194, 195, 198, 201, 206, 208, 209, 210, 214, 215, 216, 217, 219, 220
	R	CACGCTCACCGGCTCCAGATT		
<i>bla</i> _{SHV}	F	GGCCGCGTAGGCATGATAGAAA	202	SHV-2, 3, 5, 8, 9, 11, 12, 13, 15, 16, 24, 25, 26, 27, 31, 32, 33, 35, 36, 37, 38, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 48, 49, 50, 51, 52, 55, 56, 57, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 85, 86, 89, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 100, 101, 102, 103, 104, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 119, 120, 121, 128, 129, 132, 133, 134, 135, 137, 142, 143, 144, 145, 146, 156, 157, 160, 164, 168, 172, 173, 178, 179, 183, 185, 186, 187, 188, 190, 191, 194,
	R	TGACCGGCGAGTAGTCCACCAG		
<i>bla</i> _{CTX-M-1}	F	GCAAACCTGCGGAATCTGACG	182	CTX-M-1, 3, 12, 15, 22, 23, 28, 29, 33, 42, 52, 54, 55, 60, 62, 66, 69, 72, 79, 80, 82, 96, 101, 103, 114, 116, 117, 132, 136, 139, 142, 144, 150, 155, 156, 157, 162, 163, 164, 167, 170, 172, 173, 176, 179, 180, 181, 182, 183, 184
	R	CCGCGATATCGTTGGTGGTG		
<i>bla</i> _{CTX-M-2}	F	GATGGCGACGCTACCCCTGC	204	CTX-M-2, 4, 5, 6, 7, 20, 31, 35, 43, 44, 56, 59, 76, 77, 92, 95, 97, 115, 124, 131, 141, 165, 171
	T	GCGGCCGCCATCACCTTACT		
<i>bla</i> _{CTX-M-8}	F	GGGGGCGGTTGGGAGTGG	237	CTX-M-8, 40, 63
	R	CCGCCAGCGTCATCGTGC		
<i>bla</i> _{CTX-M-9}	F	AATCCGATTGCCGAAAAACACG	135	CTX-M-9, 13, 14, 16, 17, 19, 21, 24, 27, 38, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 65, 73, 81, 83, 84, 85, 87, 90, 93, 98, 99, 102, 104, 105, 112, 113, 122, 125, 126, 129, 130, 132, 134, 137, 147, 148, 159, 168, 174
	R	AGCCGTCACGCCTCCCG		
<i>bla</i> _{GES}	F	GCGGTGCAGCTTAGCGACAATG	224	GES-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31
	R	GTCAGTGCGCCGCCATAGAGG		
<i>bla</i> _{KPC}	F	GCCGCTGGCTGGCTTTTCTG	120	KPC-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 24, 25
	R	GCGCCTGAGCCGGTATCCAT		
<i>bla</i> _{IMP}	F	ACGGGTGGGGCGTTTTTCC	183	IMP-1, 3, 6, 10, 25, 30, 34, 40, 52, 55
	R	CTATTCCGCCCGTGCTGTGCG		

<i>bla_{VIM}</i>	F	CAGATTGCCGATGGTGTGGTTC	184	VIM-1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 18, 17, 19, 20, 23, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 50, 51
	R	CAATCTCCGCGAGAAGTGCCG		
<i>bla_{NDM}</i>	F	GGTTTCGGGGCAGTCGCTTC	224	NDM-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16
	R	CCATACCGCCCATCTTGCTCTG		
<i>bla_{OXA-48}</i>	F	GCGAGGCACGTATGAGCAAGATG	107	OXA-48, 162, 163, 199, 244, 245, 247, 252, 370, 405, 438, 439, 505
	R	GGCCGAAATTCGAATACCACCG		
<i>mcr-1</i>	F	GCTCTTTGGCGCGATGCTACTG	181	mcr-1
	R	GGTCTCGGCTTGGTCGGTCTG		
<i>bla_{OXA-23}</i>	F	GCTCTAAGCCGCGCAAATACAG	215	OXA-23, 27, 73, 133, 146, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 225, 239, 366, 440, 422, 423, 435, 469, 482, 483, 565, 657, 806, 807, 808, 809, 810, 811, 812, 813, 814, 815, 816, 817, 818, 911, ISAbal
	R	ATACGTCGCGCAAGTTCCTGATAG		
<i>bla_{OXA-51}</i>	F	TCCAACAAGGCCAAACTCAACAAA	154	Família OXA-51
	R	TGCCCGTCCCCTTAAATACTTCTG		
<i>bla_{OXA-58}</i>	F	GCAATATGCAAATAGGCACGGAAG	176	OXA-58, 97, 164, 397, 420, 467, 512
	R	ATTCTCCCCTCTGCGCTCTACATAC		
<i>bla_{OXA-24}</i>	F	ATTCTCCCCTCTGCGCTCTACATAC	185	OXA-24, 25, 26, 40, 72, 139, 160, 437, 653, 897
	R	CATTGCCTCACCTAAAGTC		
<i>bla_{OXA-143}</i>	F	TGGCACTTTCAGCAGTTCCT	150	OXA-143, 231, 255, 499, 825
	R	TAATCTTGAGGGGGCCAACC		
<i>bla_{SPM-1}</i>	F	TCGAATGTCTTAGTAGCGAAAATGC	197	SPM-1
	R	GTCTCCGCGCCCATCTTCT		

F: Forward; R: Reverse. Fonte: elaborado pela autora.

Quadro 4. Controles positivos dos genes de resistência.

Genes	Espécie	Fonte
<i>bla_{CTX-M-1}</i>	<i>Escherichia coli</i>	Laboratório ALERTA/SP
<i>bla_{CTX-M-2}</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	LAC/HU-UFSC
<i>bla_{CTX-M-8}</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Laboratório ALERTA/SP
<i>bla_{CTX-M-9}</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	LAC/HU-UFSC
<i>bla_{TEM}</i>	<i>Escherichia coli</i>	LAC/HU-UFSC
<i>bla_{SHV}</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	LAC/HU-UFSC
<i>bla_{GES}</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Laboratório ALERTA/SP
<i>bla_{KPC}</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Laboratório ALERTA/SP
<i>bla_{NDM}</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Laboratório ALERTA/SP
<i>bla_{IMP}</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Laboratório ALERTA/SP
<i>bla_{VIM}</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Hospital das Clínicas/SP
<i>bla_{SPM-1}</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Laboratório RBAT /SP
<i>bla_{OXA-48}</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Laboratório ALERTA/SP
<i>bla_{OXA-23}</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Laboratório ALERTA/SP
<i>bla_{OXA-51}</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Laboratório ALERTA/SP
<i>bla_{OXA-24}</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Laboratório ALERTA/SP

<i>bla_{OXA-143}</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Laboratório ALERTA/SP
<i>bla_{OXA-58}</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Laboratório RBAT/SP
<i>mcr-1</i>	<i>Escherichia coli</i>	LACEN/Paraná

Fonte: elaborado para autora.

3.6.2 Extração de DNA genômico total

A extração de DNA total foi feita por extração salina descrita por Abrão e colaboradores (ABRÃO, BILLERBECK, *et al.*, 2005), com adaptações realizadas no Laboratório MIMA.

A extração foi feita a partir de culturas frescas (máximo de 24 horas), feitas em meio MacConkey (Kasvi[®]), das bactérias que foram mantidas a -20°C em BHI com glicerol a 20%. Com uma alça estéril de 1 µL, totalmente preenchida, as colônias foram selecionadas e diluídas em 400 µL de tampão de extração TES (Tris-HCl 1 M pH 8,0, EDTA 0,5 M pH 8,0, SDS 20%) e fervidas em banho-seco por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 1 µL proteinase K (50 mg/mL) e RNase e incubadas em banho-maria por 1 hora a 42°C. Após incubação, adicionou-se 84 µL de NaCl (6 M) e os tubos foram agitados em *vortex* e centrifugados a 1100 × *g* por 5 minutos. O sobrenadante (aproximadamente 350 µL) foi transferido para outro microtubo, com o devido cuidado para não contaminar com o sedimento formado. Então, foram adicionados 700 µL de etanol absoluto gelado e centrifugado a 1100 × *g* por 5 minutos. O etanol absoluto foi descartado e o sedimento lavado duas vezes com 1000 µL de etanol 70% gelado, com posterior centrifugação a 1.100 × *g* por 1 minuto em cada lavagem. Novamente o sobrenadante foi descartado e os tubos mantidos em estufa a 60°C, para secagem do DNA. O sedimento de DNA formado foi ressuspenso em 100 µL de água ultrapura livre de DNase e RNase.

A quantidade e qualidade do DNA foi verificada por espectrofotometria a 260 nm e pela relação 260/280 e 260/230, em equipamento NanoVue Plus (GE - General Electric). Posteriormente, foi diluído na concentração de 5 ng/µL e estocado a -20°C. A integridade foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1%.

3.6.3 PCR em tempo real para detecção de genes de resistência

Para reação de PCR foi escolhido o kit GoTaq[®] qPCR Master Mix (Promega[®]) que utiliza o intercalante de DNA BRYT Green[®] Dye. Esse intercalante possui maior fluorescência por ser um corante saturante e confere uma inibição mínima da PCR, sendo mais eficiente em comparação com o tradicional SYBR[®] Green I. A DNA polimerase utilizada no kit é a *rapid hot-start*, que

permite a utilização das ciclagens rápidas, nos aparelhos de PCR que possuem essa opção. Além disso, possui um reagente (*CXR Reference dye*) que pode ser adicionado ou não a reação, dependendo se o aparelho utilizado necessita de um nível mais alto do fluoróforo de referência.

Para as reações de PCR em tempo real foi utilizado o aparelho StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems®) em placas de 96 poços (microplaca PCR-96-LP-AB-C meia borda, Axygen®). Todas as reações foram feitas em triplicata, incluindo sempre um controle negativo e um controle positivo. O volume final foi de 10 µL por reação. O *mix* foi composto por 5 µL do *master mix* GoTaq® qPCR (2X), 1 µL de cada iniciador (0,1 µM), 1,9 µL de água livre de nucleasse, 0,1 µL de CRX (Reference Dye) e 1 µL de DNA na concentração de 5 ng/µL, concentração essa, já padronizada no Laboratório MIMA como a melhor concentração para detecção em PCR.

A ciclagem de amplificação foi realizada no modo *fast*, disponível no aparelho, nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C durante 2 minutos seguida de 40 ciclos de 95°C por 5 segundos e 30 segundos a 63°C. Ao final da reação é executada a curva de *melting* com aumento gradual da temperatura, para verificação da especificidade do produto gerado. Os isolados foram avaliados conforme o Cq (*quantification cycle*), que corresponde ao ciclo no qual o sinal fluorescente da amplificação excede a fluorescência de fundo na PCR (do inglês *threshold*). O *threshold*, por sua vez, foi fixado manualmente para cada gene pesquisado.

As bactérias foram então classificadas como positivas ou negativas para o gene pesquisado, sendo um Cq menor que 30 considerado positivo. Para isolados com Cq alto, entre 28 a 32, para um gene não comumente encontrado naquela espécie de bactéria, um gel de eletroforese a 1% de agarose foi feito para a visualização da banda do produto formado. Persistindo a dúvida, a repetição dessa amostra também foi realizada.

3.6.4 Multiplex PCR para detecção de 5 variantes do gene *mcr*

Para detecção das 5 famílias do gene *mcr*, que confere resistência a polimixinas, foi utilizado uma multiplex PCR de ponto final a partir de iniciadores da literatura (Quadro 5) e com algumas modificação da técnica original (JOUSSET, BERNABEU, *et al.*, 2019).

Essa metodologia foi aplicada para os 12 isolados de *K. pneumoniae* resistentes às polimixinas e também para os isolados escolhidos para sequenciamento do genoma completo.

A extração do DNA foi a mesma utilizada para a técnica de PCR em tempo real e a multiplex foi realizada em termociclador Veriti 96-well (Applied Biosystems®) com o kit GoTaq® qPCR Master Mix (Promega®). O volume final foi de 25 µL e o *mix* composto por 12,5 µL do Master Mix GoTaq® qPCR (2X), 1,1 µL de cada um dos 10 iniciadores (0,1 µM), 0,5 µL de água livre de nucleasse e 1 µL de DNA na concentração de 50 ng/µL.

A ciclagem de amplificação seguiu as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C durante 5 minutos, 25 ciclos de 94°C por 30 segundos, anelamento a 56°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos da PCR foram adicionados em gel de agarose 2%, submetidos a eletroforese por 30 minutos a 120V, corados por brometo de etídio (1 µg/mL) e visualizados em transiluminador.

Para controle positivo da reação foi utilizado um isolado de *E. coli* positivo para *mcr-1*, para as variantes *mcr-2*, 3, 4 e 5, não conseguimos controles positivos. As 5 variantes possuem um produto final com tamanhos bem distintos, não sendo possível um equívoco na visualização das bandas.

Quadro 5. Iniciadores para detecção de *mcr-1*, 2, 3, 4 e 5 por multiplex PCR.

Genes	Sequência dos iniciadores (5'-3')		Tamanho do produto (pb)
<i>mcr-1</i>	F	TATCGCTATGTCCTAAAGCCTG	1139
	R	CGTCTGCAGCCACTGG	
<i>mcr-2</i>	F	TATCGCTATGTGCTAAAGCCTG	816
	R	AAAATACTGCGTGGCAGGTAGC	
<i>mcr-3</i>	F	CAATCGTTAGTTACACAATGATGAAG	676
	R	AACACATCTAGCAGGCCCTC	
<i>mcr-4</i>	F	ATCCTGCTGAAGCATTGATG	405
	T	GCGCGCAGTTTCACC	
<i>mcr-5</i>	F	GGTTGAGCGGCTATGAAC	207
	R	GAATGTTGACGTCACCTACGG	

Fonte: elaborado pela autora.

3.7 TIPAGEM MOLECULAR – AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO CLONAL

A metodologia de eletroforese de campo pulsado (PFGE) foi utilizada para determinar o grau de similaridade genética entre os isolados e verificar se há uma origem em comum.

3.7.1 Eletroforese de campo pulsado (PFGE)

3.7.1.1 Preparação dos blocos com DNA

A extração de DNA para técnica de PFGE é diferente da utilizadas nas outras metodologias. Nessa técnica, o DNA precisa ser inserido dentro de pequenos blocos de agarose para permanecer íntegro e posteriormente ser clivado por enzimas de restrição.

As bactérias foram semeadas em meio não seletivo *Tryptic Soy Agar* ou MacConkey, e incubadas em estufa bacteriológica a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 18 a 24 horas. Após incubação, aproximadamente três colônias isoladas (suficiente para encher uma alça de 1 μL) foram suspensas em 5 mL de caldo BHI (Sigma-Aldrich®) e mantidos novamente a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 18 a 24 horas. Posteriormente, as culturas foram centrifugadas a $1110 \times g$ por 20 minutos e os sobrenadantes desprezados. Ao sedimento foi adicionado 1 mL de TE-1 (100 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, pH 8,0) e transferido para um microtubo de 1,5 mL, que foi previamente pesado. Os microtubos foram centrifugados a $1235 \times g$ por 5 minutos, após isso, todo o sobrenadante foi removido e o microtubo pesado novamente. Para que a concentração final de cada suspensão ficasse a 1 mg/ μL para cada amostra, um volume de TE-1 foi adicionado ao sedimento de cada isolado, levando em consideração a massa de cada suspensão. Após todas as suspensões estarem na mesma concentração, 10 μL foram transferidos para outro microtubo contendo 200 μL de TE-2 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) acrescidos de 5 μL de proteinase K (50 mg/mL) e 5 μL de lisozima (40 mg/mL, diluída na hora do uso; Sigma-Aldrich®). A essa mistura, 200 μL de agarose de baixo ponto de fusão (*UltraPure™ Low Melting Point Agarose*, Invitrogen™) a 2% (m/v) foi adicionada, homogeneizada com pipeta e imediatamente aplicada aos moldes de acrílico para formação dos blocos de agarose, com cuidado para não haver formação de bolhas. O molde foi acondicionado em refrigerador a 4°C por 30 minutos até completa solidificação dos blocos. Em seguida, os blocos removidos dos moldes foram adicionados em tubos contendo 5 mL de Tampão de lise (50 mM Tris, 50 mM EDTA, 1% sarcosil) acrescidos de 10 μL de proteinase K (50 mg/mL) e mantidos em banho-maria a 55°C por 2 horas. Após a incubação, os tubos foram mantidos por 10 minutos na geladeira para que os blocos ficassem mais firmes pós banho-maria. Em seguida, o tampão de lise foi totalmente removido e os blocos lavados por cinco vezes, duas com água ultrapura estéril e três com TE-2. Após as lavagens, os blocos foram armazenados em TE-2 a 4°C , podendo ficar armazenados por até seis meses.

3.7.1.2 Clivagem do DNA com enzima de restrição

Na clivagem do DNA com a enzima de restrição, os blocos preparados foram cortados em pedaços de aproximadamente quatro milímetros de largura e colocados em microtubos de 0,2 mL. Adicionou-se a esses microtubos a enzima de restrição específica para cada espécie de bactéria. A reação de clivagem foi feita em um volume final de 50 µL.

Para *K. pneumoniae* e *Enterobacter* spp. foram adicionados 44 µL de água ultrapura estéril, 5 µL de tampão Thermo Scientific Tango e 1 µL da enzima de restrição XbaI (10 unidades por amostra; ThermoFisher Scientific©). Em seguida, foi incubado em termociclador a 37°C por 4 horas. A enzima clivou o DNA cromossômico no sítio de restrição T[^]CTAGA.

Para *A. baumannii* foram adicionados ao microtubo 43,5 µL de água ultrapura, 5 µL de tampão A 10X, 0,5 µL de soro fetal bovino acetilado e 1 µL da enzima de restrição ApaI (10 unidades por amostra; Promega®). Em seguida, incubado a 37°C por 4 horas. A enzima clivou o DNA cromossômico no sítio de restrição GGGCC[^]C.

Para os isolados de *P. aeruginosa* o procedimento foi igual ao feito com *A. baumannii*, apenas trocando a enzima para SpeI (Promega®). A enzima clivou o DNA cromossômico no sítio de restrição A[^]CTAGT.

3.7.1.3 Eletroforese em gel de agarose em campo pulsado

Para a preparação do gel foram utilizados moldes com capacidade de 15 ou 45 amostras, com 1,2% de agarose ultra-pura (UltraPure Agarose – Invitrogen™). Após a completa solidificação da agarose os blocos contendo o DNA clivado dos isolados e o padrão de tamanho molecular Lambda PFG Ladder (New England Biolabs Inc.) foram adicionados nos poços do gel. O padrão foi adicionado no início e no final do gel, no molde de 15 poços, e para o de 45 poços, foi incluído um padrão adicional no meio do gel, para facilitar a análise posteriormente. Após colocar todos os blocos no gel, os poços foram selados com agarose de baixo ponto de fusão.

O equipamento utilizado para a eletroforese foi o CHEF-DR® III (Bio-Rad®). Na cuba de eletroforese, adicionou-se 2,5 litros de tampão TBE 0,5X acrescido de tiourea (aproximadamente 50 µM de tiourea em 2,5 litros de tampão) e o módulo de resfriamento foi programado para 14°C. Somente após o tampão atingir a temperatura desejada e todas as bolhas formadas nas mangueiras do aparelho terem sido retiradas, o gel foi inserido no equipamento utilizando o molde e os fixadores.

Após testar diversas condições de corridas para cada espécie de bactérias, a corrida seguiu as mesmas condições para todas as espécies. As condições escolhidas propuseram a melhor separação entre as bandas: pulso inicial de 5 segundos, pulso final 35 segundos, voltagem 6 V/cm, ângulo de 120° e tempo de corrida de 24 horas.

Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídeo na concentração de 1 µg/mL por 35 minutos e submetido ao transiluminador UV (LTB-HE, Loccus) para a visualização dos fragmentos de DNA e em seguida fotografado.

3.7.1.4 Análise dos padrões moleculares

Para análise das bandas geradas após a eletroforese foi utilizado o programa Bionumerics (Applied-Maths). Nesse programa, um dendrograma foi gerado para cada uma das espécies bacterianas. O grau de similaridade entre os isolados foi determinado pelo coeficiente de Dice e a correlação para agrupamento foi calculado pelo método da ligação média entre grupos (UPGMA, do inglês *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*), com otimização de 1,5% e tolerância de 1,5%. A otimização limita o movimento para cada perfil de eletroforese como um todo e a tolerância limita o movimento de cada banda.

O perfil gerado pela eletroforese foi analisado segundo critérios de Tenover e colaboradores, que compara os isolados com o padrão mais prevalente entre todos e classifica em 4 categorias: (1) “indistinguível”, quando o isolado é idêntico ao isolado mais prevalente não tendo nenhuma diferença no número de bandas; (2) “intimamente relacionados,” quando possui somente um evento genético como uma mutação, inserção ou deleção do DNA, diferindo em duas ou três bandas; (3) “possivelmente relacionado”, quando difere em quatro ou seis bandas, que pode ocorrer por dois eventos genéticos como uma inserção, deleção, ganho ou perda de sítio de restrição; e quando um isolado é (4) “não relacionado”, seus padrões diferem em mais de sete bandas, sendo menos de 50% similar ao isolado mais prevalente, podendo ter tido 3 ou mais eventos genéticos (TENOVER, ARBEIT, *et al.*, 1995). Essa classificação é demonstrada de maneira mais clara na Tabela 1.

Tabela 1. Critérios para interpretação da PFGE

Classificação segundo Tenover	Nº de eventos genéticos	Nº de bandas diferentes	Interpretação do resultado
Indistinguíveis	0	0	Isolado é parte de um surto
Intimamente relacionados	1	2-3	Isolado é provavelmente parte de um surto
Possivelmente relacionados	2	4-6	Isolado é possivelmente parte de um surto
Não relacionados	≥3	≥7	Isolado não faz parte de um surto

Fonte: elaborado pela autora.

3.8 SEQUENCIAMENTO DO GENOMA COMPLETO

Foram escolhidos 5 isolados para sequenciamento do genoma completo com base no resultado dos genes de resistência encontrados. As bactérias que possuíam vários genes de resistência e com genes de resistências considerados raros para aquela espécie, foram incluídas. As amostras foram sequenciadas pela empresa *Neoprosecta Microbiome Technologies*.

3.8.1 Sequenciamento

A extração do DNA foi feita pelo QIAamp DNA Blood Mini Kit, segundo recomendações do fabricante. O preparo da biblioteca de sequenciamento foi realizado com o kit Nextera Flex com CD indexes (Illumina), de acordo com as instruções do fornecedor. A amostra foi sequenciada no equipamento MiSeq system (Illumina), com a formatação *paired-end* 300x200 pb, 500 mil *reads*/amostra.

3.8.2 Análise computacional dos resultados

A avaliação da qualidade das *reads* (leituras) dos dados brutos foi feita utilizando a ferramenta *FastQC*, em que o *Phred Quality Score* foi de no mínimo 30 (significa uma probabilidade de erro de leitura de 1 em 1000, tendo 99,9% de acertos). Para montagem dos *contigs* e *scaffolds*, iniciou-se com a trimagem das sequências, em que se retirou as sequências de baixa qualidade e os adaptadores que foram utilizados durante o sequenciamento. Para a trimagem foi utilizado o programa Trimmomatic v 0.39.

Posteriormente, foi realizada a montagem de novo das sequências utilizando o *pipeline* SPAdes v3.13.1 (BANKEVICH, NURK, *et al.*, 2012). Para avaliar a qualidade da montagem foram considerados os seguintes parâmetros: tamanho da sequência, número e tamanho dos *contigs* gerados, a métrica de contiguidade N50 (tamanho do menor *contig* no conjunto dos maiores *contigs*, que combinados representem 50% da montagem), a métrica L50 (número de *contigs* que somados representem 50% do genoma), a métrica N90 (tamanho do menor *contig* no conjunto dos maiores *contigs*, que combinados representem 90% da montagem) e a métrica L90 (número de *contigs* que somados representem 90% do genoma). O objetivo para um sequenciamento de qualidade foi poucos *contigs*, porém longos.

A montagem das sequências, com os genes de resistências e os possíveis plasmídeos, foi feita com o pipeline PlasmidSPAdes (ANTIPOV, HARTWICK, *et al.*, 2016). A anotação dos plasmídeos e dos genes de resistência foi feita utilizando a ferramenta Prokka 1.14.6f (SEEMANN, 2014). Também foi complementada por anotações manuais, com base em comparações com sequências similares encontradas pelo alinhamento feito no BLASTn, disponível em <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, e também pela base de dados de proteínas UniProt (BATEMAN, 2019).

Por meio do banco de dados disponíveis no *Center for Genomic Epidemiology* (<http://www.genomicepidemiology.org>) foi possível determinar o resistoma dos isolados utilizando o ResFinder 4.0 (BORTOLAIA, KAAS, *et al.*, 2020), análise da tipagem de sequência multilocus, usando o MLST 2.0 (LARSEN, COSENTINO, *et al.*, 2012) e a pesquisa de grupos de incompatibilidade plasmidial com o PlasmidFinder 2.1 (CARATTOLI, ZANKARI, *et al.*, 2014).

As figuras dos plasmídeos e dos genes de resistência foram feitas utilizando o programa SnapGene (GSL Biotech), disponível em: <https://www.snapgene.com>.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Bactérias Gram-negativas do grupo ESKAPE têm se destacado em todo o mundo como importantes patógenos causadores de IRAS e possuem resistência a grande parte, ou total, aos antimicrobianos que estão disponíveis no mercado. Vários documentos, como os já citados anteriormente da OMS, CDC e ECDC, estão chamando a atenção para esse problema alarmante. Essas instituições têm disponibilizado relatórios nos quais são identificados os patógenos mais problemáticos e que necessitam de intervenção urgente, bem como a convocação pela OMS para todos os países participarem de um plano global que visa conter a resistência antimicrobiana. Dessa forma, pesquisas epidemiológicas para melhor conhecimento de cada país sobre essas ameaças são um dos primeiros passos para conseguir implementar medidas de controle.

Cada uma das quatro espécies estudadas (*K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* e *Enterobacter* spp.) possui suas particularidades quanto aos genes de resistência, virulência, formação de biofilme, sítios mais comuns de infecção, entre outras características. Para todas as espécies já houve a descrição de mecanismos de resistência que inutilizam a última classe de antimicrobianos que é usado na prática clínica, as polimixinas. O estado de Santa Catarina não possui um estudo amplo para determinação de quais espécies de bactérias e seus genes de resistência são as mais predominantes, apenas estudos isolados e regionais que nos dão uma breve ideia da situação.

Por meio desses estudos feitos em Santa Catarina e por trabalhos realizados por grupos de pesquisas no Brasil todo, temos o conhecimento que as bactérias Gram-negativas são um grande problema no nosso país, destacando-se as enterobactérias e também os bacilos não-fermentadores da glicose. Dessa forma, para este trabalho foram escolhidas as bactérias Gram-negativas pertencentes ao grupo ESKAPE, grupo bastante conhecido por sua capacidade de resistência aos antimicrobianos, compreendendo as espécies: *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp.

Ao longo de 13 meses (janeiro de 2018 a janeiro de 2019), isolados provenientes de doze hospitais de Santa Catarina foram selecionadas juntamente com o LACEN/SC foram incluídos no estudo.

4.1 ISOLADOS BACTERIANOS

Em julho de 2018 os isolados começaram a ser disponibilizadas pelo LACEN/SC e foram entregues todas as bactérias de janeiro a julho de 2018. A partir desse mês, conforme disponibilidade do LACEN/SC, eram entregues para o Laboratório MIMA mensalmente conforme recebiam os resultados de genes de resistência do LACEN/PR. Os isolados foram enviados pelos hospitais seguindo os critérios estabelecidos pelo LACEN/SC e disponibilizados na Nota Técnica de 2016 (explicada no tópico 3.2 Hospitais).

Como já mencionado, os isolados de enterobactérias com testes fenotípicos inconclusivos são enviadas para o LACEN do Paraná na cidade de Curitiba, assim como todos os não-fermentadores resistentes aos carbapenêmicos, para detecção de genes de resistência aos antimicrobianos. Do montante desses isolados bacterianos foram selecionados 153 isolados de bactérias Gram-negativas do grupo ESKAPE, distribuídas entre as 5 regiões do estado, para a pesquisa deste trabalho. Como mencionado anteriormente, o LACEN/SC recebe uma média de 150 isolados mensais de bactérias Gram-negativas, sendo em média 84 pertencentes ao grupo ESKAPE. Neste estudo, recebemos uma média de 12 isolados por mês, totalizando os 153 isolados.

As amostras foram nomeadas para facilitar o reconhecimento de onde pertenciam. O primeiro número do isolado diz respeito a uma das 5 regiões do estado, e a letra no final refere-se ao hospital a que pertence naquela região. Como, por exemplo, o isolado 1.2A: pertence a região 1 do estado, isolado número 2 e ao hospital A dessa região.

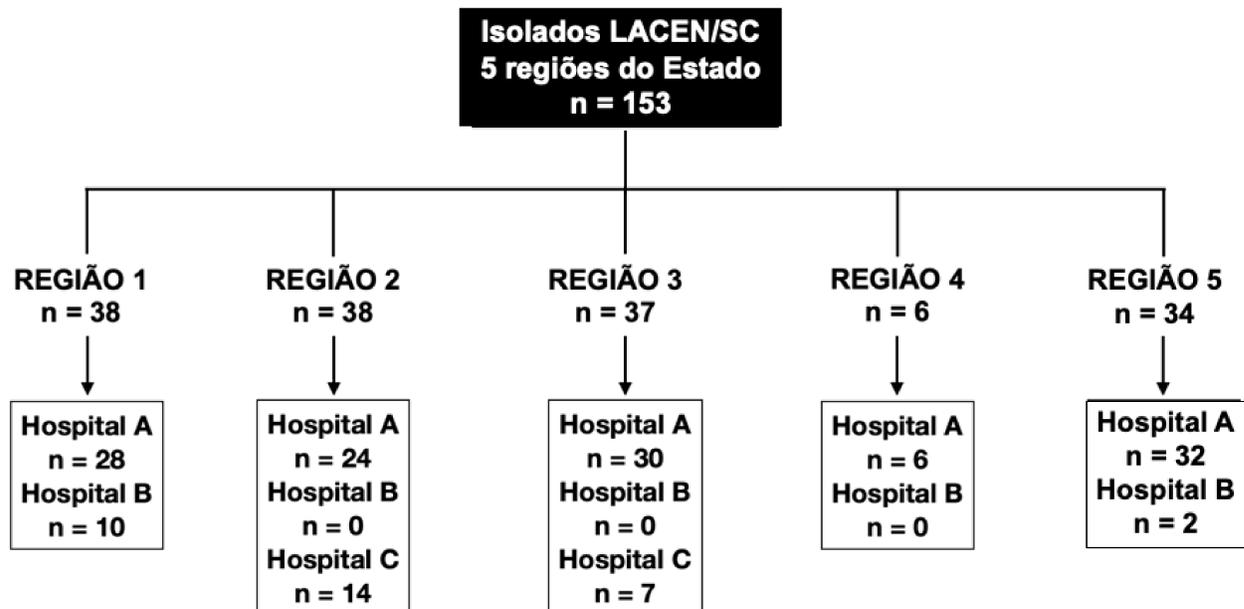
Infelizmente, não foram disponibilizadas informações sobre a quantidade de isolados recebidas específicas de cada espécie, por região e por hospital, durante os 13 meses da pesquisa. Também não nos foram fornecidos dados clínicos das amostras, como idade e sexo dos pacientes e o material clínico que foram isoladas as bactérias, somente foram fornecidos os dados para as amostras que foram sequenciadas.

Vale ressaltar que apesar da Nota Técnica de 2016 (LACEN/CECISS, 2016), que criou o protocolo de envio de bactérias Gram-negativas para o LACEN/SC, mencionar isolados de *Acinetobacter* spp. sem especificar a espécie, os resultados foram apresentados como *Acinetobacter baumannii*, pois os isolados foram positivos para a oxacilinase OXA-51 (resultado demonstrado posteriormente) que é uma enzima cromossomicamente codificada e intrínseca da espécie de *A. baumannii* podendo ser utilizada para diferenciação dessa espécie (EVANS, AMYES, 2014).

É importante ressaltar o viés amostral do presente estudo. Não foi possível escolher os isolados com um critério mais significativo de inclusão junto ao LACEN/SC, para que assim tivéssemos um montante representativo do estado de Santa Catarina. Ao receber as amostras percebemos que havia muito mais isolados do grupo dos não-fermentadores da glicose do que de enterobactérias, porém não foi possível trocar ou adicionar mais isolados para amenizar esse viés. Dessa maneira, os 153 isolados foram caracterizados como pertencentes ao estado de Santa Catarina e os resultados foram expressados sem afirmar que as taxas encontradas pelas metodologias (por ex. espécie mais encontrada, genes de resistência e TSA) eram representativas do estado. Apesar desse viés, foram encontrados resultados interessantes de genes de resistência que não tinham sido relatados no estado e pode-se perceber uma grande circulação de cepas clonais ou relacionadas nas 5 regiões de estado entre as quatro espécies estudadas.

As regiões com mais isolados analisados foram as regiões 1 e 2 com 38 isolados cada, seguido da região 3 (n = 37), 5 (n = 34) e 4 (n = 6). As regiões 2 e 3 possuem 3 hospitais cada e as demais possuem 2. A Figura 3 mostra a distribuição dos isolados entre as 5 regiões e respectivos hospitais.

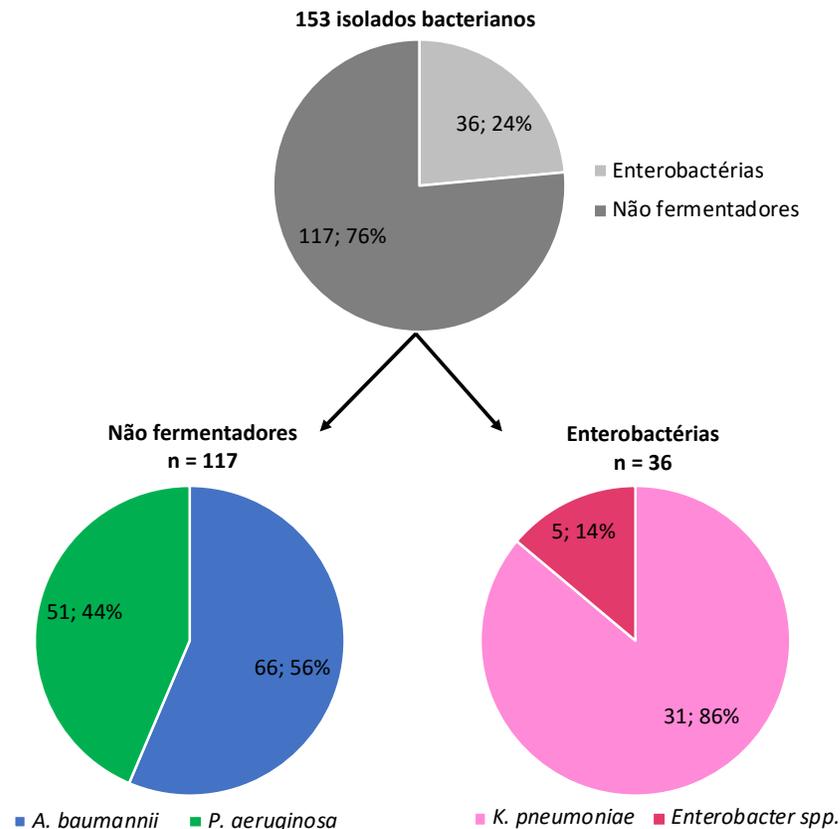
Figura 3 - Distribuição dos isolados entre os hospitais das 5 regiões do estado de Santa Catarina



Fonte: elaborado pela autora.

Dos 153 isolados selecionados, 117 (76%) foram de não-fermentadores, sendo 66 isolados de *A. baumannii* (56,4%) e 51 de *P. aeruginosa* (43,6%). As enterobactérias foram 36 (23,5%), sendo 5 *Enterobacter* spp. (13,5%) e 31 de *K. pneumoniae* (86%) (Figura 5). A média foi de 12 isolados bacterianos por mês, sendo maio o mês com mais isolados (n = 21) e fevereiro com menos (n = 6), Quadro 6.

Figura 4. Distribuição dos 153 isolados entre não-fermentadores e enterobactérias.



Fonte: elaborado pela autora.

Quadro 6. Distribuição espacial e temporal dos isolados de janeiro de 2018 a janeiro de 2019 que foram selecionadas para o projeto.

		REGIÃO 1		REGIÃO 2			REGIÃO 3			REGIÃO 4		REGIÃO 5		TOTAL- BAC	TOTAL- MÊS
		Hospital A	Hospital B	Hospital A	Hospital B	Hospital C	Hospital A	Hospital B	Hospital C	Hospital A	Hospital B	Hospital A	Hospital B		
Jan - 2018	Kp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	6
	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
	Ab	-	-	-	-	1	2	-	-	-	-	1	-	3	
	Pa	2	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	
Fev - 2018	Kp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	6
	E	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	2	
	Ab	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	2	-	3	
	Pa	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
Mar - 2018	Kp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	11
	E	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	
	Ab	-	-	2	-	1	1	-	-	-	-	1	-	6	
	Pa	2	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	4	
Abril - 2018	Kp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	8
	E	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1	
	Ab	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1	-	2	
	Pa	-	1	2	-	1	-	-	-	-	-	1	-	5	
Maio - 2018	Kp	1	-	1	-	-	-	-	-	3	-	1	2	8	21
	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
	Ab	-	-	2	-	1	2	-	-	-	-	1	-	6	
	Pa	2	1	-	-	1	1	-	1	-	-	1	-	7	
Jun - 2018	Kp	1	-	1	-	-	1	-	-	1	-	-	-	4	14
	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
	Ab	1	-	1	-	1	-	-	-	1	-	2	-	6	
	Pa	1	-	1	-	-	1	-	-	-	-	1	-	4	
Jul - 2018	Kp	2	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	4	13
	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
	Ab	-	-	1	-	1	2	-	-	-	-	2	-	6	
	Pa	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	3	

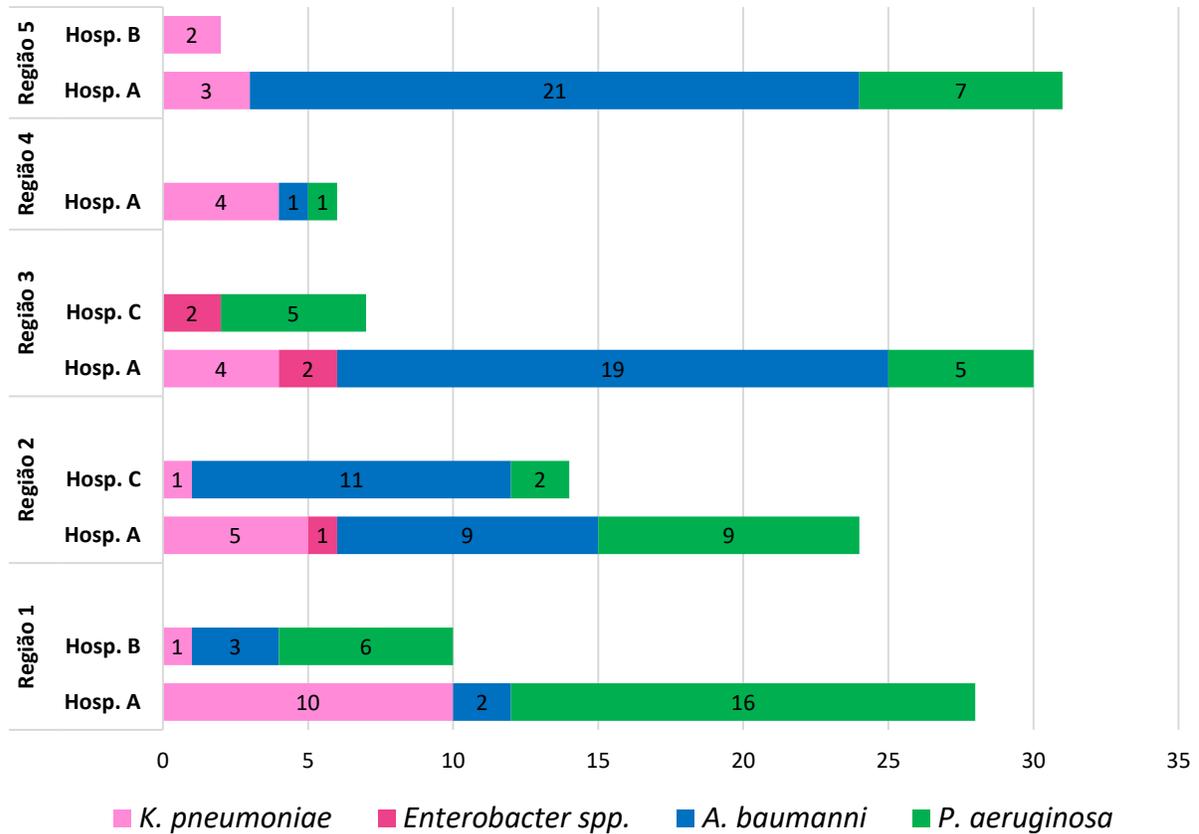
Ago - 2018	Kp	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	2	13
	E	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
	Ab	-	-	1	-	3	1	-	-	-	-	2	-	7	
	Pa	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	3	
Set - 2018	Kp	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	3	12
	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
	Ab	-	-	1	-	-	2	-	-	-	-	1	-	4	
	Pa	1	1	2	-	-	1	-	-	-	-	-	-	5	
Out - 2018	Kp	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	2	11
	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
	Ab	-	-	-	-	1	3	-	-	-	-	2	-	6	
	Pa	2	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	3	
Nov - 2018	Kp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	11
	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
	Ab	1	-	-	-	1	2	-	-	-	-	3	-	7	
	Pa	2	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	4	
Dez - 2018	Kp	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	2	13
	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
	Ab	-	1	1	-	-	1	-	-	-	-	1	-	4	
	Pa	1	2	1	-	-	-	-	2	-	-	1	-	7	
Jan - 2019	Kp	2	1	1	-	-	1	-	-	-	-	1	-	6	14
	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Ab	-	2	-	-	-	2	-	-	-	-	2	-	6	
	Pa	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	
TOTAL (Região)	38		38				37			6		34		153	
TOTAL (Hospital)	28	10	24	0	14	30	0	7	6	0	32	2			

BAC: Bactérias; Kp: *Klebsiella pneumoniae*; E: *Enterobacter* spp.; Ab: *Acinetobacter baumannii*, Pa: *Pseudomonas aeruginosa*.

Fonte: elaborado pela autora.

No Gráfico 1, temos o número de isolados de cada espécie por região, divididos entre os hospitais participantes.

Gráfico 1. As 5 regiões e seus hospitais com respectivos números de isolados de cada espécie.



Fonte: elaborado pela autora.

4.2 PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

4.2.1 Disco-difusão em ágar

O método de disco-difusão é um dos mais antigos para realização do TSA e ainda é amplamente utilizado na rotina dos laboratórios clínicos do mundo todo. Apesar de ser uma técnica teoricamente simples e utilizada na rotina de muitos laboratórios de microbiologia, essa metodologia precisa de muita atenção em todas as etapas. Qualquer etapa da sua realização pode levar a um resultado errôneo. Pequenas variações desde a preparação e armazenamento dos meios de cultura, preparação correta do inóculo, inoculação das placas, aplicação dos discos, incubação por tempo correto, aferição dos halos e a qualidade dos materiais, pode levar a resultados falsos (ÂHMAN, MATUSCHEK, *et al.*, 2019, BRCAS, 2017, SEJAS, SILBERT, *et al.*, 2003).

Para realização do TSA para os isolados bacterianos foi escolhida a técnica de disco-difusão em ágar recomendada pelo BrCAST e CLSI (BRCAST, 2020, CLSI, 2020), com exceção das polimixinas em que foi utilizado a disco-diluição e a microdiluição em caldo, que será comentada posteriormente. Para os isolados de enterobactérias foram utilizados os pontos de corte do BrCast. Já para os isolados de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp., optou-se pelo manual do CLSI, que possui pontos de corte para mais antimicrobianos, visando ampliar o perfil de sensibilidade analisado.

No último ano, houve uma mudança importante quanto a classificação das bactérias após realização do TSA. As bactérias passaram a ser classificadas em três categorias de sensibilidade: Sensível, dose padrão (S), quando há uma alta probabilidade de sucesso terapêutico utilizando o regime de dose padrão; Sensível, exposição aumentada (I), quando há uma alta probabilidade de sucesso terapêutico ajustando-se o regime de dosagem ou sua concentração; e Resistente (R), quando há alta probabilidade de falha terapêutica mesmo com aumento da exposição (EUCAST, 2019).

O termo “intermediário” foi substituído pela expressão “Sensível, exposição aumentada”, porém a abreviatura reportada continua a ser “I”. Ou seja, alterou-se as definições e manteve-se as abreviaturas. Um microrganismo ainda pode ser reportado como Sensível (S) e Resistente (R), mas não se pode mais utilizar o termo “resistência intermediária” para um antimicrobiano. Em vez disso, deve-se reportar como “Sensível, exposição aumentada” com a abreviatura “I”. Durante o processo de consulta que foi feito para realizar essa mudança, a maioria recomendou a não alteração da abreviatura “I” neste momento, não impedindo uma mudança futura (EUCAST, 2019).

4.2.2 Classificação em MDR, XDR e PDR

Após a classificação das bactérias em sensíveis e resistentes, podemos classificar quanto ao perfil de resistência que apresentam. Um grupo de especialistas de vários países, juntamente com o ECDC e CDC, criaram uma terminologia padrão para descrever o perfil de resistência das bactérias responsáveis por IRAS. Dessa forma, os resultados encontrados em qualquer estudo podem ser comparados entre si, facilitando a troca de informações entre as autoridades e pesquisadores de saúde pública (MAGIORAKOS, SRINIVASAN, *et al.*, 2012).

Foram criadas categorias de antimicrobianos especificamente para cada tipo de bactéria (Anexos A, B e C), sendo possível classificá-las multidroga-resistente (MDR), extensivamente

resistente (XDR) e pandroga-resistente (PDR). MDR, quando a bactéria é não sensível a pelo menos um agente em três ou mais categorias de antimicrobianos; XDR, quando não sensível a pelo menos um agente em todas, exceto duas ou menos categorias; e PDR, quando não sensível a todos os agentes em todas as categorias (MAGIORAKOS, SRINIVASAN, *et al.*, 2012).

Nos casos em que não foi possível testar todos os antimicrobianos de todas as categorias, os isolados ainda podem ser caracterizados como “possível XDR” e “possível PDR”, mas esses resultados não podem ser comparados com outros “possíveis XDR e PDR” de estudos diferentes. Mesmo assim, essa classificação deve ser considerada como um marcador de resistência extensiva e seu uso deve ser incentivado apesar das limitações em sua interpretação (Anexo D) (MAGIORAKOS, SRINIVASAN, *et al.*, 2012).

Um isolado pode ser considerado um possível XDR, quando já é classificado como um MDR que seja resistente a pelo menos 1 antimicrobiano em todas as categorias testadas, porém alguma categoria de antimicrobianos não foi testada e, portanto, não podendo ser concluída a classificação. Um isolado pode ser considerado um possível PDR quando já é classificado como XDR tendo resistência para todos os antimicrobianos testados, porém alguma categoria não foi testada. Dessa forma, não conseguindo avaliar se poderia, ou não, ser classificado como PDR (Anexo D).

Como se trata de uma pesquisa, selecionamos os principais antimicrobianos utilizados para tratamento clínico no Brasil. Apesar de selecionarmos uma grande quantidade de antimicrobianos, não conseguimos abranger todos os listados em todas as categorias (Anexos A, B e C). Para laboratórios clínicos, é enfatizado a necessidade de se ter testes adicionais, além dos testados rotineiramente, quando um isolado “possível XDR ou PDR” for encontrado.

4.2.2.1 Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos isolados de enterobactérias

No Quadro 7, estão expostos os resultados do TSA das enterobactérias assim como a classificação como MDR, XDR e PDR. Apesar de não utilizar o manual do CLSI para os resultados, os pontos de corte para os halos foram deixados na tabela para fim de comparação (somente para os que possuíam a mesma concentração do disco de antimicrobiano utilizado no BrCAST), para verificar se mudariam o resultado e, conseqüentemente, impactar na terapêutica clínica.

Para o TSA das enterobactérias conseguimos testar 13 categorias de antimicrobianos das 17 existentes, segundo Magiorakos e colaboradores (MAGIORAKOS, SRINIVASAN, *et al.*,

2012). Duas delas não possuíam ponto de corte para *K. pneumoniae* e *Enterobacter* spp. no BrCAST, e as outras duas, não conseguimos testar. Com isso, várias amostras foram classificadas como possível XDR ou possível PDR.

A presença de ESBL, detectadas pelo teste de sinergismo de disco duplo, foi encontrada em 18 isolados (50%) entre as 36 enterobactérias. Essas amostras foram confirmadas com PCR e todas apresentaram algum gene para ESBL, reafirmando a presença desse tipo de enzima. Esse resultado será mais bem discutido com os resultados da PCR.

ESBL são um grupo de enzimas que causam resistência as oximino-cefalosporinas e aos monobactâmicos e, conseqüentemente, o tratamento para infecções por esse tipo de resistência é comumente o uso de carbapenêmicos. Esse cenário causou um aumento no uso dos carbapenêmicos levando a emergência global de bactérias carbapenem-resistentes que preocupa o mundo todo (PEIRANO, PITOUT, 2019). Nos últimos anos tem emergido com taxas maiores que 50% em áreas da Ásia, África e América Latina e começa a aparecer em países desenvolvidos, o que antes não era comum (WHO, 2014a).

Todos os 31 isolados de *K. pneumoniae* apresentaram resistência a todas as penicilinas, às cefalosporinas (1ª, 2ª, 3ª e 4ª geração), à sulfonamida (sulfametoxazol/trimetoprim) e às fluoroquinolonas (ciprofloxacina e norfloxacina). Apresentaram resistência a pelo menos 1 ou aos 3 carbapenêmicos testados (ertapenem, imipenem e meropenem). Das 31 divergências entre BrCAST e CLSI, em 23 casos as amostras foram resistentes pelo BrCAST e sensível, dose padrão pelo CLSI e em 6 casos o resultado foi ao contrário, sendo considerado resistente pelo CLSI e sensível pelo BrCAST, esses 6 casos aconteceram com discos de carbapenêmicos. Os outros 2 casos tiveram diferenças entre ser sensível, dose padrão e sensível, exposição aumentada.

Dos 31 isolados, 24 foram classificados como MDR, possível XDR (77,4%) e 7 isolados como XDR, possível PDR (22,6%), sendo que 5 dos 7 pertencem à mesma região do estado de Santa Catarina (Região 1).

Os cinco isolado de *Enterobacter* spp. foram resistentes a todas as penicilinas, às cefalosporinas (1ª, 2ª, 3ª e 4ª geração), a sulfonamida (sulfametoxazol/trimetoprim), ao aztreonam e aos três carbapenêmicos testados. Foram quatro classificados como XDR e um como MDR.

Um estudo feito utilizando 102 isolados de *K. pneumoniae* de 11 estados do Brasil, sendo eles: Rio de Janeiro, Espírito Santo, Minas gerais, Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, abrangendo todas as regiões do país com exceção da Norte, com isolados entre 2009 a 2013, corrobora os nossos dados (AIRES, PEREIRA, *et al.*, 2020). Foi encontrado uma taxa de 78% de MDR e 21% de XDR, além de um isolado PDR. A maioria dos isolados foram resistentes a todos os β -lactâmicos (95%), apresentaram 91% de resistência aos carbapenêmicos, 95% a ciprofloxacina, 90% a

sulfametoxazol/trimetoprim e 62% a gentamicina. Para polimixina B obtiveram 92% de sensibilidade, já em nosso estudo a taxa foi menor, com 71% de sensibilidade, sendo que esse aumento da resistência às polimixinas pode ser pelo fato das amostras serem mais recentes (2018), o que condiz com outros estudos que também observaram um aumento na taxa de resistência a esse antimicrobiano após 2013 (FERREIRA, DA SILVA, *et al.*, 2019, LORENZONI, RUBERT, *et al.*, 2018).

Um estudo prospectivo observacional feito em um hospital universitário no estado do Rio Grande do Sul avaliou a evolução da resistência aos antimicrobianos entre 1.805 isolados de *K. pneumoniae* entre os anos de 2015 a 2016. Os resultados foram bastante alarmantes, principalmente por se tratar da comparação de apenas um ano. Foi encontrado um aumento da resistência à colistina (239,3%), meropenem (74,2%), ciprofloxacina (68%), gentamicina (35,1%), tigeciclina (33,9%), imipenem (29,7%), ertapenem (26,8%) e amicacina (21,4%) (LORENZONI, RUBERT, *et al.*, 2018). Assim como nosso estudo, todos os isolados com resistência à polimixinas apresentaram resistência aos carbapênicos.

Outra informação que chama a atenção é o aumento da resistência entre os aminoglicosídeos. No estudo mencionado acima, observaram um aumento de 21,4% para amicacina (LORENZONI, RUBERT, *et al.*, 2018). Outro estudo, mostra um aumento na resistência à gentamicina de 6% em 2010 para 20% em 2014 (GIACOBBE, DEL BONO, *et al.*, 2015). As polimixinas são utilizadas para o tratamento de bactérias com resistência aos carbapenêmicos juntamente com tigeciclina (para *E. coli*) e muitas vezes combinado com os aminoglicosídeos amicacina e gentamicina. Os aminoglicosídeos tais como a amicacina que tem mostrado uma maior atividade do que a gentamicina, possuem uma boa atividade *in vitro* contra bactérias resistentes aos carbapenêmicos, muitas vezes utilizados como monoterapia (MORRILL, POGUE, *et al.*, 2015, TRECARIKI, TUMBARELLO, 2017). Entre os isolados de *K. pneumoniae* do nosso estudo, obtivemos 54,8% de resistência à amicacina e 64,5% para gentamicina. Levando em consideração que essa classe é bastante utilizada para o tratamento de bactérias carbapenem-resistentes, esse resultado é bem expressivo.

Até pouco tempo atrás, as bactérias resistentes eram majoritariamente classificadas como MDR, sendo que a taxa de isolados XDR do nosso estudo (22,6%) e de outros mostrados acima é preocupante e tem sido bastante relatada nos últimos anos no Brasil indicando que em um futuro próximo, poderemos ter aumento de relatos de bactérias PDR (AIRES, PEREIRA, *et al.*, 2020, ANDRADE, VITALI, *et al.*, 2014).

4.2.2.2 Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *A. baumannii*

Para *A. baumannii* foi utilizado os pontos de cortes para halos do CLSI (CLSI, 2020), pois, como comentado anteriormente, o BrCAST não possui ponto de corte para alguns antimicrobianos que são utilizados na clínica. Os pontos de corte para os halos do BrCAST foram deixados na tabela para fim de comparação (somente para os que possuíam a mesma concentração do disco de antimicrobiano utilizado no CLSI), para verificar se mudariam o resultado e, conseqüentemente, impactar na terapêutica clínica.

Para classificação dos isolados em MDR, XDR e PDR testamos 8 das 9 categorias proposta para essa classificação. A categoria que faltou foi a de polimixinas em que os isolados não foram testados com um teste aprovado pelo CLSI, apenas pelo teste de triagem de disco-diluição que ainda está em fase de validação para esse patógeno. Levando em consideração o teste de triagem, 100% dos isolados foram sensíveis às polimixinas, porém esse resultado não foi utilizado para classificação. O resultado para polimixas e dos testes aprovados será mais bem discutido em tópico posterior específico para esse assunto (4.2.3 Disco-diluição e microdiluição em caldo das polimixinas).

Os 66 isolados de *A. baumannii* apresentaram resistência a vários antimicrobianos, sendo 100% resistentes a piperacilina/tazobactam, a todas as cefalosporinas (cefotaxima, cefepime, ceftriaxona, ceftazidima), com exceção de um isolado que foi sensível à cefotaxima, aos carbapenêmicos, fluoroquinolonas e amicacina (Quadro 8). Um aumento da incidência de IRAS por esse patógeno foi relatado nas últimas décadas, sempre chamando atenção pelo aumento da resistência a todas às cefalosporinas, fluoroquinolonas, sulfametoxazol/trimetoprim, aminoglicosídeos e carbapenêmicos (SKARIYACHAN, TASKEEN, *et al.*, 2019). Das 38 divergências entre CLSI e BrCAST, em 26 casos os isolados foram classificados como sensíveis, exposição aumentada pelo CLSI e resistentes pelo BrCAST e em 12 casos o resultado foi sensível, dose padrão pelo CLSI e resistente pelo BrCAST. A maioria dos casos (n = 29) aconteceram com discos de tobramicina e 9 casos com amicacina.

Diferente das enterobactérias, dos 66 isolados de *A. baumannii*, 41 (62,1%) foram classificados como XDR, sendo 2 isolados como XDR, possível PDR, e uma menor taxa de isolados MDR, 37,9% (n = 25). As regiões 2 (n = 17/20) e 5 (n = 13/21) apresentaram mais bactérias XDR do que MDR, já a região 3 (n = 19) apresentou o contrário, com 14 MDR e 5 XDR. As regiões 1 e 4 que possuem poucos isolados (5 e 1, respectivamente), todos foram classificados como XDR

(Quadro 8). A taxa global observada em *A. baumannii* MDR é de 70-90% variando conforme o país (MOHD SAZLLY LIM, SIME, *et al.*, 2019).

Quadro 8. Perfil de sensibilidade dos isolados de *A. baumannii*.

BrCAST-2020	Ponto de corte para diâmetro de halos (mm)	R		I		S		R		I		S		R		I		S		MDR, XDR ou PDR
		≥21	18-20	≥15	12-14	≥23	15-22	≥14	15-17	≥14	14-20	≥13	15-17	≥14	14-16	≥13	13-14	≥12	15-16	
CLSI-2020	Ponto de corte para diâmetro de halos (mm)	R		I		S		R		I		S		R		I		S		MDR, XDR ou PDR
		≥21	18-20	≥15	12-14	≥23	15-22	≥14	15-17	≥14	14-20	≥13	15-17	≥14	14-16	≥13	13-14	≥12	15-16	
Não Fermentador	Isolados	Pen. + inibidores			Cefalosporinas				Carba		Fluoroq.		Aminoglicosídeos			Tetrac.	Outros			
		TPZ	SAM	CTX	FEP	CRO	CAZ	IPM	MEM	CIP	LVX	TMN	AKN	GMN	TET	SXT				
<i>A. baumannii</i>	1.5A	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	XDR
<i>A. baumannii</i>	1.24A	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	XDR
<i>A. baumannii</i>	1.14B	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	XDR
<i>A. baumannii</i>	1.16B	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	XDR
<i>A. baumannii</i>	1.17B	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	XDR
<i>A. baumannii</i>	2.12A	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	XDR
<i>A. baumannii</i>	2.13A	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	XDR
<i>A. baumannii</i>	2.7A	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	XDR
<i>A. baumannii</i>	2.9A	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	XDR
<i>A. baumannii</i>	2.5A	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	XDR
<i>A. baumannii</i>	2.2A	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	XDR
<i>A. baumannii</i>	2.1C	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	XDR
<i>A. baumannii</i>	2.20A	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	XDR
<i>A. baumannii</i>	2.21A	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	XDR
<i>A. baumannii</i>	2.26A	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	XDR
<i>A. baumannii</i>	2.12C	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	XDR
<i>A. baumannii</i>	2.9C	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	MDR
<i>A. baumannii</i>	2.7C	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	XDR
<i>A. baumannii</i>	2.5C	R	I	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	MDR
<i>A. baumannii</i>	2.2C	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	XDR
<i>A. baumannii</i>	2.13C	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	XDR
<i>A. baumannii</i>	2.14C	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	XDR
<i>A. baumannii</i>	2.15C	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	XDR
<i>A. baumannii</i>	2.17C	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	MDR
<i>A. baumannii</i>	2.18C	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	XDR
<i>A. baumannii</i>	3.16A	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	MDR
<i>A. baumannii</i>	3.17A	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	MDR
<i>A. baumannii</i>	3.13A	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	XDR
<i>A. baumannii</i>	3.11A	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	XDR
<i>A. baumannii</i>	3.7A	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	XDR
<i>A. baumannii</i>	3.8A	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	MDR
<i>A. baumannii</i>	3.1A	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	MDR
<i>A. baumannii</i>	3.2A	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	MDR
<i>A. baumannii</i>	3.21A	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	XDR
<i>A. baumannii</i>	3.22A	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	MDR
<i>A. baumannii</i>	3.24A	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	MDR
<i>A. baumannii</i>	3.25A	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	MDR
<i>A. baumannii</i>	3.26A	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	MDR
<i>A. baumannii</i>	3.27A	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	MDR
<i>A. baumannii</i>	3.28A	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	MDR
<i>A. baumannii</i>	3.30A	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	XDR
<i>A. baumannii</i>	3.31A	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	MDR
<i>A. baumannii</i>	3.32A	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	MDR
<i>A. baumannii</i>	3.34A	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	MDR
<i>A. baumannii</i>	4.1A	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	XDR
<i>A. baumannii</i>	5.17A	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	MDR
<i>A. baumannii</i>	5.18A	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	XDR
<i>A. baumannii</i>	5.19A	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	MDR
<i>A. baumannii</i>	5.15A	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	XDR
<i>A. baumannii</i>	5.11A	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	MDR
<i>A. baumannii</i>	5.8A	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	MDR
<i>A. baumannii</i>	5.5A	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	XDR
<i>A. baumannii</i>	5.6A	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	MDR
<i>A. baumannii</i>	5.2A	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	XDR
<i>A. baumannii</i>	5.3A	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	XDR
<i>A. baumannii</i>	5.23A	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	XDR
<i>A. baumannii</i>	5.24A	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	MDR
<i>A. baumannii</i>	5.27A	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	XDR
<i>A. baumannii</i>	5.28A	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	XDR
<i>A. baumannii</i>	5.29A	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	MDR
<i>A. baumannii</i>	5.30A	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	XDR
<i>A. baumannii</i>	5.31A	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	MDR
<i>A. baumannii</i>	5.32A	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	XDR
<i>A. baumannii</i>	5.35A	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	XDR, possível PDR
<i>A. baumannii</i>	5.37A	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	XDR
<i>A. baumannii</i>	5.38A	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	XDR, possível PDR
Taxa de resistência		100%	59,1%	98,5%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	27,3%	100%	60,6%	22,7%	94%			
Taxa de sensibilidade			40,9%	1,5%									72,7%		39,4%	77,3%	6%			
Sensível, dose padrão (S)			25,7%										47%		27,3%	48,5%	6%			
Sensível, exposição aumentada			15,2%	1,5%									25,7%		12,1%	28,8%				

S, sensível dose padrão; I, sensível, exposição aumentada; R, resistente; TPZ, piperacilina/tazobactam; SAM, ampicilina/sulbactam; CTX, cefotaxima; FEP, cefepime; CRO, ceftriaxona; CAZ, ceftaxidima; IPM, imipenem; MEM, meropenem; CIP, ciprofloxacina; LVX, levofloxacina; TMN, tobramicina; AKN, amicacina; GMN, gentamicina; TET, tetraciclina; SXT, sulfametoxazol/trimetropim. Nos locais que apresentam duas categorias (I/R ou S/R), mostra a divergência da classificação entre CLSI/ BrCAST, respectivamente. Fonte: elaborado pela autora.

Um estudo feito no estado de Santa Catarina com 118 amostras de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos de um hospital público, entre os anos de 2011 a 2013, apresentou resultados iguais ao nosso estudo para alguns antimicrobianos, como a taxa de 100% de resistência ao cefepime, ceftriaxona, ciprofloxacina, imipenem, meropenem e piperacilina/tazobactam. Já para os aminoglicosídeos, amicacina e gentamicina, foram relatadas taxas de 80,5% e 83,9% de resistência, respectivamente, e 94% de resistência à ampicilina/sulbactam (CORTIVO, GUTBERLET, *et al.*, 2015). Em nosso estudo foi observado 100% de resistência à amicacina e uma menor taxa para gentamicina, 60,6%, e 59% de resistência para ampicilina/sulbactam. Já para sulfametoxazol/trimetoprim o resultado foi praticamente o oposto, pois encontramos 94% de resistência contra apenas uma amostra resistente no estudo citado.

Ranjbar e colaboradores observaram uma taxa de 94,5% de resistência aos carbapenêmicos entre 163 isolados pesquisados e 78,5% foram classificados como XDR, uma taxa maior do que MDR, assim como nosso estudo (RANJBAR, FARAHANI, 2019). Em um estudo feito pelo nosso grupo de pesquisa no Laboratório MIMA, das 140 amostras de *A. baumannii* isoladas no ano de 2015, no Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago/UFSC, 96,9% foram resistentes aos carbapenêmicos (TARTARI, 2016). Outro estudo feito em dois hospitais em Cuiabá/MT do Brasil observou uma taxa de 91,9% de resistência ao imipenem e 98,8% de sensibilidade à colistina (DE AZEVEDO, DUTRA, *et al.*, 2019).

Uma revisão sistemática, que avaliou surtos em hospitais de 22 países por bactérias não-fermentadoras da glicose (*A. baumannii* e *P. aeruginosa*), mostrou que dos 150 surtos publicados causados por *A. baumannii*, 113 (75,3%) foram causados por bactérias MDR com uma taxa de mortalidade de 47,1%. Essa revisão sistemática ainda chama a atenção para uma não padronização da classificação em MDR, XDR e PDR entre os estudos, pois alguns não testaram antimicrobianos suficientes para a classificação, com isso, muitos MDR podem ser possíveis XDR (WIELAND, CHHATWAL, *et al.*, 2018). Outro estudo, que revisou publicações entre os anos de 2003 a 2013 em 18 países da América Latina, encontraram taxas de até 90% de resistência aos carbapenêmicos sendo que a maioria dos países tiveram taxas superiores a 50% (LABARCA, SALLES, *et al.*, 2016).

Uma análise de cinco UTI de referência do estado de Goiás encontrou 56 pacientes com infecção por *A. baumannii* em que o sítio de infecção mais frequente foram os pulmões (53,1%), sítio cirúrgico (10,9%), trato urinário (7,8%) e corrente sanguínea (6,2%), sendo que a mortalidade relacionada com a infecção foi de 67,9% dos pacientes. *A. baumannii* é conhecida por causar

infecções em pacientes hospitalizados, sendo que as infecções pulmonares relacionadas com ventilação mecânica são as que mais se destacam. Nesse estudo observaram 76,8% de resistência aos carbapenêmicos, 60,7% à ampicilina/sulbactam, 96,4% à cefepime, 91,1% às quinolonas e 21,4% à amicacina. A maioria dos isolados foram MDR (91,1%) e 4 amostras classificadas como XDR (CASTILHO, GODOY, *et al.*, 2017).

Romanin e colaboradores caracterizaram 103 isolados de *A. baumannii* isolados de corrente sanguínea durante 10 anos (2006 a 2016), na cidade de Londrina no estado do Paraná. No estudo observaram dados semelhantes aos nossos, em que os isolados apresentaram 92,2% de resistência aos carbapenêmicos; cefalosporinas, 99,7%; fluoroquinolonas, 98%; amicacina, 41,7%; gentamicina 69,9%; ampicilina/sulbactam, 57,3%; piperacilina/tazobactam, 95,1%; tetraciclina, 33% e sulfametoxazol/trimetoprim, 87,4%, porém, tiveram uma taxa maior de resistência às polimixinas, 10,7%, do que o encontrado no presente estudo. A maioria dos isolados foram classificados como XDR, 78,9% (ROMANIN, PALERMO, *et al.*, 2019).

A tigeciclina, ainda citada em estudos com *A. baumannii*, foi bastante utilizada na clínica, esse antimicrobiano alcança baixos níveis no soro do paciente indo rapidamente para os tecidos, não sendo uma boa opção de tratamento (LEE, C, LEE, *et al.*, 2017, SKARIYACHAN, TASKEEN, *et al.*, 2019). A tigeciclina não apresenta mais um ponto de corte para o TSA pelo CLSI e BrCAST, portanto não foi testada para os isolados.

As polimixinas são a última classe de antimicrobianos disponíveis para tratamento de infecções causadas por *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos e, até poucos anos atrás, a resistência a esse antimicrobiano era considerada rara, porém cada vez mais há relatos sobre essa resistência (MOHD SAZLLY LIM, SIME, *et al.*, 2019).

4.2.2.3 Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *P. aeruginosa*

Assim como para *A. baumannii*, para *P. aeruginosa* foram utilizados os pontos de cortes do CLSI (CLSI, 2020) e também foram mantidos na tabela os pontos de corte do BrCAST para fins de comparação. Para classificação dos isolados em MDR, XDR e PDR testamos 7 das 8 categorias propostas para essa classificação não sendo possível realizar o teste para fosfomicina, pois não há ponto de corte no CLSI. Para polimixinas foi realizado o teste de disco-diluição aprovado pelo CLSI 2020 que será comentado especificamente no próximo tópico (4.2.3 Disco-diluição e microdiluição em caldo das polimixinas).

Um fato interessante ao fazer o TSA dos isolados de *P. aeruginosa* foi encontrar um isolado que produziu um pigmento vermelho-acastanhado, a piorrubina (Apêndice A). Espécies de

P. aeruginosa são conhecidas por produzirem pigmentos como a piocianina (azul), pioverdina (esverdeado) e mais raramente a piorrubina (vermelho) e a piomelanina (preto). Esses pigmentos já foram associados com atividade competitiva contra outras bactérias, resistência a stress oxidativo e efeito sobre a integridade do epitélio respiratório do hospedeiro, que está ligada com a produção de biofilme. A produção de biofilme é um fator de virulência dessa espécie que facilita a colonização da bactéria na superfície do hospedeiro e é regulada por vias complexas, incluindo o *quorum sensing*, que também regula a produção de pigmentos como a piorrubina. A produção de biofilme e piorrubina são considerados fatores de virulência dessa espécie (MERINO, 2007, PARDUCHO, BEADELL, *et al.*, 2020). A única *P. aeruginosa* produtora desse pigmento foi o isolado 3.29A, pertencente a região 3 do hospital A, o isolado foi classificado como XDR.

Dos 51 isolados de *P. aeruginosa*, observou-se uma maior taxa de resistência para piperacilina/tazobactam, 51%; ciprofloxacina, 58,8%; levofloxacina, 62,7%; gentamicina, 56,9% e 96,1% para os carbapenêmicos (Quadro 8). Como já mencionado na metodologia, foram priorizados isolados com resistência aos carbapenêmicos, porém, duas amostras apresentaram sensibilidade para esses antimicrobianos. Isso pode ser pelo fato de os isolados terem ficado um tempo maior em freezer a -20°C até ser feito o TSA, podendo ter perdido a resistência, pois essa metodologia foi a última a ser realizada para os isolados. Outra possibilidade é um engano no momento da seleção dessas duas amostras pelo LACEN/SC. Os dois isolados não foram desconsiderados e foram mantidos no estudo, pois para as outras metodologias os isolados já tinham sido incluídos nas análises dos resultados.

Foram encontradas 47 divergências entre os resultados do CLSI e BrCAST, em 31 delas os isolados foram classificados como sensível, exposição aumentada pelo CLCI e resistente pelo BrCAST, em 6 foram consideradas sensível, dose padrão pelo CLSI e resistente pelo BrCAST, e por fim, 10 isolados considerados sensível, exposição aumentada pelo CLSI sendo sensível, dose padrão pelo BrCAST. A maioria das divergências aconteceu com discos de aztreonam (n = 19), cefepime (n = 12) e levofloxacina (n = 8), e em menor número com amicacina, gentamicina, imipenem, ciprofloxacina e tobramicina.

Quanto à classificação de resistência aos antimicrobianos, 21 isolados foram classificados como XDR, 21 como MDR e 9 não tiveram classificação. Entre os 9 sem classificação, por apresentarem um perfil de maior sensibilidade, 7 foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados com exceção dos carbapenêmicos (Quadro 8).

Na mesma revisão sistemática citada anteriormente, que avaliou surtos de bactérias não-fermentadoras da glicose em 22 países, dos 90 isolados de *P. aeruginosa*, 37,4% foram classificados como MDR e apresentaram uma taxa de 23,3% de mortalidade, sendo menor do que em *A. baumannii*. No estudo de Labarca e colaboradores, que avaliaram trabalhos sobre a América Latina publicados ao longo de 12 anos (2002 a 2013), encontrou-se uma taxa de 66% de resistência aos carbapenêmicos (WIELAND, CHHATWAL, *et al.*, 2018).

Shortidge e colaboradores publicaram um estudo geográfico e temporal dos fenótipos de resistência de *P. aeruginosa* analisando dados de um programa de monitoramento que existe desde 1997 e monitora mais de 400 centros médicos do mundo (*SENTRY Antimicrobial Surveillance Program*). Os autores analisaram 52.022 isolados submetidos ao Programa SENTRY por 20 anos (1997 a 2016), da Região da Ásia/Pacífico, Europa, América Latina e América do Norte. Assim como em *A. baumannii*, a principal infecção por esse patógeno foi a infecção pulmonar com 44,6% (n = 22.227) seguido de infecção na corrente sanguínea (14.539, 27,9%), infecção de pele (9.952, 19,1%) e em menor porcentagem outros sítios de infecção. As taxas de MDR com o passar dos anos tiveram flutuações na maioria das regiões, com uma taxa de 27,5% entre 2005-2008 e uma diminuição para 21,8%, entre 2013-2016. Isolados XDR também foram mais prevalentes em 2005-2008 (20,2%). A maior frequência de *P. aeruginosa* MDR foi encontrado na América latina (41,1%), seguido da Europa (28,4%), América do Norte (18,9%) e Ásia/Pacífico (18,8%). A sensibilidade na América do Norte e Europa foram relativamente estáveis com poucas variações em cada período, já na América Latina as variações foram maiores, com aumento da resistência à amicacina de 70,2% entre 2001-2004 para 86,8% entre 2013-2016. Para os carbapenêmicos a sensibilidade de 70,8% entre 1997-2000 diminuiu para 56,2% entre 2009-2012 e aumentou novamente para 67,7%, entre 2013-2016. Essas flutuações também foram observadas na região da Ásia/Pacífico. No geral, para a América Latina as maiores taxas de MDR e outros fenótipos de resistência ocorreram entre 2005-2008 e diminuíram no período seguinte (2013-2016). Essa taxa menor nos últimos anos (2013-2016) foi associada a um aumento da sensibilidade aos aminoglicosídeos e β -lactâmicos e com uma diminuição na detecção do clone XDR de *P. aeruginosa* carreadora da enzima SPM-1, que confere resistência a todos os antimicrobianos excetuando-se às polimixinas. Esse clone foi bastante detectado entre 2005-2008 e estudos mostraram uma diminuição na frequência desse clone nos anos seguintes, podendo ser a causa do aumento na sensibilidade nessa espécie (SHORTRIDGE, GALES, *et al.*, 2019).

Um estudo retrospectivo avaliou 6.473 isolados bacterianos provenientes de nove UTI do Hospital São Paulo da Universitário Federal de São Paulo (HSP/HU UNIFESP) entre os anos de

2010 a 2013. Dos 6.473 isolados, 939 foram identificados como *P. aeruginosa* sendo 457 (48,7%) classificados como MDR, com prevalência maior nos anos de 2010 e 2013. Observaram um aumento da resistência para os antimicrobianos imipenem, meropenem e polimixinas e uma diminuição para amicacina, correlacionando-se positivamente ao consumo desses antimicrobianos (RIBEIRO, CROZATTI, *et al.*, 2020).

Um fenótipo de resistência foi observado entre os isolados do presente estudo, em que 23 *P. aeruginosa* apresentaram resistência aos carbapenêmicos, mas não às cefalosporinas (cefepime e ceftazidima). Esse perfil incomum também foi descrito por Campana e colaboradores, e para entender o fenótipo avaliaram 25 isolados da cidade de São Paulo provenientes de hospitais. Todos os isolados apresentaram uma falta ou expressão reduzida da porina de membrana externa OprD, essa mutação causa resistência somente à carbapenêmicos não interferindo na resistência de outros β -lactâmicos como as cefalosporinas. O estudo alerta para a capacidade adaptativa da bactéria *P. aeruginosa* sob pressão seletiva antimicrobiana, nesse caso pelo amplo uso de carbapenêmicos no mundo todo. Usa-se muito mais carbapenêmicos para o tratamento das infecções fazendo com que essa espécie se adapte especificamente para essa classe, ocorrendo a sensibilidade a outros β -lactâmicos que antes também eram considerados resistentes (CAMPANA, XAVIER, *et al.*, 2017).

Quadro 9. Perfil de sensibilidade dos isolados de *P. aeruginosa*.

BrCAST-2020	Ponto de corte para diâmetro de halos (mm)	R	<21		<20		<18		<26		<22		<18		<16		<15		<15		>2*		>2*		MDR, XDR ou PDR
		I	S																						
CLSI-2020	Ponto de corte para diâmetro de halos (mm)	R	≤14		≥18		≥18		≥18		≥18		≥18		≥18		≥18		≥18		≥24*		≥24*		MDR, XDR ou PDR
		I	S																						
Não Fermentador	Isolados	Pen+inib		Cefalosp.		Carba.		Fluoroquinolonas			Monob.		Aminoglicosídeos			Polimixinas*									
		TPZ	FEP	CAZ	IPM	MEM	CIP	NXN	LVX	ATM	TMN	AKN	GMN	Pol E	Pol B										
<i>P. aeruginosa</i>	1.30A	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S						XDR	
<i>P. aeruginosa</i>	1.31A	R	R	R	R	R	R	R	I	R	I/S	R	R	R	R	R	S	S						XDR	
<i>P. aeruginosa</i>	1.15A	S	S	S	I/R	S	R	I	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S						-	
<i>P. aeruginosa</i>	1.11A	I	I/R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S						-	
<i>P. aeruginosa</i>	1.12A	R	R	R	R	R	R	S	S	S	I/S	S	S	S	S	S	S	S						MDR	
<i>P. aeruginosa</i>	1.7A	R	S	I	R	R	S	S	S	S	I/S	S	S	R	S	S	S	S						MDR	
<i>P. aeruginosa</i>	1.8A	S	S	S	R	R	R	S	S	I/R	S	S	S	S	S	S	S	S						-	
<i>P. aeruginosa</i>	1.6A	I	S/R	S	R	R	R	R	R	R	I/S	R	R	R	R	S	S	S						MDR	
<i>P. aeruginosa</i>	1.3A	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S						XDR	
<i>P. aeruginosa</i>	1.18A	S	S/R	S	R	R	R	I	R	I/S	S	S	S	S	S	S	S	S						MDR	
<i>P. aeruginosa</i>	1.21A	R	I/R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S						XDR	
<i>P. aeruginosa</i>	1.22A	S	S	S	R	R	S/R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S						MDR	
<i>P. aeruginosa</i>	1.25A	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S						-	
<i>P. aeruginosa</i>	1.26A	I	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S						MDR	
<i>P. aeruginosa</i>	1.27A	I	S/R	S	R	R	R	I	R	I/R	S	S	S	S	S	S	S	S						MDR	
<i>P. aeruginosa</i>	1.34A	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I/R	S	S	S	S	S	S	S						XDR	
<i>P. aeruginosa</i>	1.8B	R	R	R	R	R	R	S	S	I/R	S	R	R	R	R	S	S	S						MDR	
<i>P. aeruginosa</i>	1.7B	R	I/R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S						XDR	
<i>P. aeruginosa</i>	1.9B	R	R	R	R	R	R	S	S	I/R	R	R	I/S	R	S	S	S	S						MDR	
<i>P. aeruginosa</i>	1.10B	R	R	I	R	R	S	S	S	I/R	R	I/S	R	S	S	S	S	S						MDR	
<i>P. aeruginosa</i>	1.12B	R	R	R	R	R	R	R	R	I/R	R	R	R	R	S	S	S	S						XDR	
<i>P. aeruginosa</i>	1.13B	I	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S						MDR	
<i>P. aeruginosa</i>	2.18A	S	S	S	R	R	S	S	I/R	I/R	S	S	S	S	S	S	S	S						MDR	
<i>P. aeruginosa</i>	2.10A	S	S	S	R	R	S	S	I/R	S	S	S	R	S	S	S	S	S						MDR	
<i>P. aeruginosa</i>	2.11A	S	S	S	R	R	S	S	I/R	S	S	S	S	S	S	S	S	S						MDR	
<i>P. aeruginosa</i>	2.4A	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S						XDR	
<i>P. aeruginosa</i>	2.1A	R	S	R	R	R	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R	S	S						XDR	
<i>P. aeruginosa</i>	2.22A	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S						XDR	
<i>P. aeruginosa</i>	2.23A	S	S	S	R	R	S	S	R	I/R	S	S	I/R	S	S	I/R	S	S						MDR	
<i>P. aeruginosa</i>	2.25A	I	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S						XDR	
<i>P. aeruginosa</i>	2.28A	I	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S						XDR	
<i>P. aeruginosa</i>	2.6C	R	R	S	R	R	R	R	R	R	I/R	R	R	R	R	S	S	S						XDR	
<i>P. aeruginosa</i>	2.4C	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S						-	
<i>P. aeruginosa</i>	3.6A	S	S	S	R	R	S	S	I/R	I/R	S	S	S	S	S	S	S	S						-	
<i>P. aeruginosa</i>	3.4A	S	S	S	R	R	S	S	I/R	S	S	S	S	S	S	S	S	S						-	
<i>P. aeruginosa</i>	3.20A	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S						-	
<i>P. aeruginosa</i>	3.23A	S	S	S	R	R	S	S	I/R	S	S	S	S	S	S	S	S	S						-	
<i>P. aeruginosa</i>	3.29A	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S						XDR	
<i>P. aeruginosa</i>	3.6C	I	I/R	S	R	R	R	R	R	I/S	R	R	R	R	R	R	S	S						MDR	
<i>P. aeruginosa</i>	3.7C	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S						XDR	
<i>P. aeruginosa</i>	3.8C	I	S/R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S						MDR	
<i>P. aeruginosa</i>	3.9C	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S						XDR	
<i>P. aeruginosa</i>	3.10C	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S						XDR	
<i>P. aeruginosa</i>	4.6A	R	I/R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	I/R	S	S						XDR	
<i>P. aeruginosa</i>	5.14A	R	S/R	I	R	R	R	S	R	I/R	S	S	S	S	S	S	S	S						MDR	
<i>P. aeruginosa</i>	5.12A	R	I/R	I	R	R	R	S	R	I/R	S	S	S	S	S	S	S	S						MDR	
<i>P. aeruginosa</i>	5.7A	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S/R	R	R	R	R	S	S	S						XDR	
<i>P. aeruginosa</i>	5.4A	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S						MDR	
<i>P. aeruginosa</i>	5.1A	R	R	S	R	R	R	R	R	I	R	I/S	R	S	S	S	S	S						XDR	
<i>P. aeruginosa</i>	5.22A	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S						XDR	
<i>P. aeruginosa</i>	5.34A	S	I/R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S						MDR	
Taxa de resistência		51%	45,1%	31,4%	96,1%	96,1%	58,8%	45,1%	62,7%	27,5%	47,1%	35,3%	56,9%												
Taxa de sensibilidade		49%	54,9%	68,6%	3,9%	3,9%	41,2%	54,9%	37,3%	72,5%	52,9%	64,7%	43,1%	100%	100%										
Sensível, dose padrão (S)		31,4%	41,2%	56,9%	2%	3,9%	41,2%	47,1%	21,6%	33,3%	52,9%	58,8%	39,2%												
Sensível, exposição aumentad		17,6%	13,7%	11,7%	2%			7,8%	15,7%	39,2%		5,9%	3,9%												

S, sensível dose padrão; I, sensível, exposição aumentada; R, resistente; TPZ, piperacilina/tazobactam; FEP, cefepime; CAZ, ceftazidima; IPM, imipenem; MEM, meropenem; CIP, ciprofloxacina; NXN, norfloxacina; LVX, levofloxacina; ATM, aztreonam; AKN, ampicilina; GMN, gentamicina. * CIM para polimixinas feita por disco-diluição. (-) não classificado em nenhuma das três categorias (MDR, XDR e PDR). Nos locais que apresentam duas categorias (I/R, I/S ou S/R), mostra a divergência da classificação entre CLSI/ BrCAST, respectivamente. Fonte: elaborado pela autora.

Vale ressaltar que apesar dos isolados selecionados para o presente estudo serem conhecidamente resistentes aos carbapenêmicos, essa resistência é conhecida globalmente, não sendo um problema exclusivo de um patógeno, como podemos perceber em várias pesquisas. Essa resistência faz parte da maioria das espécies, como podemos ver nos quatro isolados deste estudo. Com os dados do programa de vigilância de antimicrobianos SENTRY, que monitora hospitais sentinelas da América Latina desde 1997, tendo mais de 20 anos de coleta de dados com mais de 1 milhão de isolados bacterianos estudados (FUHRMEISTER, JONES, 2019), foram gerados diversos trabalhos, como o estudo que avaliou 5.704 bactérias Gram-negativas (*K. pneumoniae*, *Enterobacter* spp. *E. coli*, *Acinetobacter* spp. e *P. aeruginosa*) entre os anos de 2008 e 2010, comparando com os dados do início do projeto. Observaram taxas crescentes de resistência aos carbapenêmicos com o passar dos anos: de 6,4%, 12,6% e 0,0%, entre os anos de 1997 a 1999, para 84,9%, 71,4% e 50% de 2008 a 2010, na Argentina, Brasil e Chile, respectivamente. No Brasil, os quatro centros que fizeram parte desse estudo estão localizados em São Paulo, Florianópolis, Porto Alegre e Brasília (GALES, CASTANHEIRA, *et al.*, 2012).

Esses dados de aumento de resistência são refletidos em nosso estudo para todas as espécies estudadas. Por ser uma resistência bem comum em nosso estado, não houve dificuldades para selecionar bactérias com essa característica. Com o avanço dessa resistência aos carbapenêmicos, restam poucos antimicrobianos para serem utilizados em infecções causadas por esses patógenos.

É importante ressaltar que a interpretação do TSA na clínica, onde é visado o tratamento dos pacientes, deve-se levar em conta as considerações citadas nos documentos disponíveis do EUCAST (*Expert rules and intrinsic resistance*, disponível em https://www.eucast.org/expert_rules_and_intrinsic_resistance/). Esses documentos trazem informações sobre resistências intrínsecas, fenótipos de resistência excepcional e regras interpretativas, que foram baseados em relatos de casos, dados experimentais e dados microbiológicos *in vitro*, podendo serem aplicados na interpretação do TSA para melhorar o tratamento do paciente.

4.2.3 Disco-eluição e microdiluição em caldo das polimixinas

O uso extensivo e indiscriminado de antimicrobianos na medicina humana e veterinária tem contribuído para a emergência de bactérias Gram-negativas resistente aos carbapenêmicos e a todas as classes de antimicrobianos. Com o surgimento dos bacilos Gram-negativos resistentes aos

carbapenêmicos, às polimixinas tornaram-se o antimicrobiano de escolha para o tratamento desses patógenos. No entanto, estudos têm mostrado taxas de resistência aumentadas a esse antimicrobiano (LIU, WANG, *et al.*, 2016).

As duas polimixinas utilizadas na clínica são a polimixina E (colistina) e a polimixina B, que diferem somente por um aminoácido e possuem atividade biológica comparável. O mecanismo de resistência a esses antimicrobianos é pela modificação no lipídio A da membrana externa, resultando na redução da afinidade da polimixina. A modificação se dá pela adição de grupos catiônicos, fosfoetanolamina (pETN) e/ou 4-amino-L-arabinose (L-Ara4N), que diminui a carga eletronegativa do lipídio A, resultando na repulsão da polimixina carregada positivamente. A adição desses grupamentos é causada por mecanismos codificados por cromossomos como os sistemas de componentes (pmrAB, phoPQ e mgrB) e recentemente pela expressão de uma fosfoetanolamina transferase codificada por plasmídeos (gene *mcr-1*) (AIRES, PEREIRA, *et al.*, 2016, FERNANDES, MOURA, *et al.*, 2016, LIU, WANG, *et al.*, 2016).

A disco-diluição em caldo é um teste mais simples de ser realizado na rotina de um laboratório clínico, quando se compara com a microdiluição em caldo que é considerada o padrão-ouro para detecção da CIM. No lugar de antimicrobianos de referência, que são necessários para a microdiluição, são utilizados discos impregnados com o antimicrobiano. Como se trata de uma proposta nova, para polimixina E, a comparação das duas técnicas é interessante para saber se são equivalentes e se poderá ser utilizada como triagem em um laboratório de rotina microbiológica. Também é importante saber se os resultados da polimixina E podem ser extrapolados para a polimixina B.

Outro ponto importante é o fato da natureza policatiônica das polimixinas que podem se aderir em vários tipos de materiais, como por exemplo os plásticos (KARVANEN, MALMBERG, *et al.*, 2017). Essa característica pode levar a um resultado incorreto nos resultados da CIM. No teste de disco-diluição proposto, os tubos utilizados são de vidro.

O teste de disco-diluição de polimixina E foi realizado para todos os 153 isolados. Como controle positivo, utilizamos 4 isolados de *E. coli* com gene *mcr-1* que confere resistência às polimixinas. Uma bactéria foi considerada resistente às polimixinas quando apresentaram uma CIM > 2 µg/mL, segundo BrCAST e o CLSI. Apesar disso, para validar essa metodologia com os isolados do estudo, os resultados com CIM igual a 2 µg/mL também foram selecionados para fazer a microdiluição em caldo, a fim de comparar as duas metodologias.

Somente para as enterobactérias tivemos resultados positivos e apresentaram uma taxa alta. Dos 31 isolados de *K. pneumoniae*, 29% (n = 9) apresentaram resistência às polimixinas (E e B) e 7 desses, eram XDR, possível PDR. Entre os isolados de *Enterobacter* spp., 4 dos 5 apresentaram resistência às polimixinas e todos eram XDR. (Tabela 2).

A resistência em *K. pneumoniae* tem sido relatada em várias regiões e cada ano tem aumentado mais, incluindo Europa, América do Norte, América do Sul, Ásia e África do sul (AH, KIM, *et al.*, 2014). Dados do SENTRY, programa de vigilância global entre os anos de 2006 a 2009, mostrou uma taxa geral de resistência à polimixina em *K. pneumoniae* de 1,5%, sendo que a maior taxa foi observada na América Latina (2,1%). A resistência na América Latina teve um aumento de 1,3% para 3%, de 2006 a 2009. Esse aumento foi acompanhado da redução da susceptibilidade aos carbapenêmicos (GALES, JONES, *et al.*, 2011).

Um estudo encontrou clones epidêmicos em 2 hospitais do Rio de Janeiro no ano de 2016, no qual 23 isolados de *K. pneumoniae* apresentaram resistência à polimixina B com CIM ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$ e com altos níveis de resistência a todas as classes de antimicrobianos, inclusive com isolados PDR (resistentes a todos os antimicrobianos testados). Esses isolados apresentaram genes de resistência do tipo *bla*_{KPC}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA-1}, sendo que a resistência à polimixina não era mediada por plasmídeos e a CIM das amostras foram ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$ (LONGO, DE SOUSA, *et al.*, 2019). Uma maior mortalidade também foi relatada em pacientes com infecção por *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos e polimixinas (ROJAS, SALIM, *et al.*, 2017).

O aumento da resistência às polimixinas com o passar dos anos coincidiu também com o aumento do uso de polimixinas como terapia para tratar infecções graves quando Gram-negativos são possíveis agentes etiológicos em hospitais e também com o maior uso desse antimicrobiano em animais (SAMPAIO, GALES, 2016).

Os resultados obtidos na disco-diluição (polimixina E) foi o mesmo encontrado para microdiluição em caldo (polimixinas E e B). Para os isolados deste estudo, sempre que se obteve um resultado resistente ou sensível com CIM = 2 $\mu\text{g/mL}$ na disco-diluição, o mesmo foi confirmado com microdiluição em caldo. A exceção foi para os controles de *E. coli* com o gene *mcr-1*, que confere resistência às polimixinas. No teste da disco-diluição, os 4 controles testados tiveram um resultado sensível e quando foi feito a microdiluição em caldo, esse resultado passou a ser resistente (Tabela 2).

Tabela 2. Resultado de disco-eluição e microdiluição em caldo de polimixinas.

Bactérias	Isolados	CIM	CIM	CIM	Perfil
		Disco-eluição polimixina E µg/mL	Microdiluição polimixina E µg/mL	Microdiluição polimixina B µg/mL	
<i>E. coli</i>	Controle 1 <i>mcr-1</i>	2	16	8	Resistente*
<i>E. coli</i>	Controle 2 <i>mcr-1</i>	<1	16	8	Resistente*
<i>E. coli</i>	Controle 3 <i>mcr-1</i>	<1	16	8	Resistente*
<i>E. coli</i>	Controle 4 <i>mcr-1</i>	<1	16	8	Resistente*
<i>K. pneumoniae</i>	1.1A	>4	16	8	Resistente
<i>K. pneumoniae</i>	1.2A	>4	64	32	Resistente
<i>K. pneumoniae</i>	1.32A	2	1	0,5	Sensível
<i>K. pneumoniae</i>	1.19A	>4	16	8	Resistente
<i>K. pneumoniae</i>	1.20A	>4	16	8	Resistente
<i>K. pneumoniae</i>	1.23A	>4	16	8	Resistente
<i>K. pneumoniae</i>	1.29A	>4	64	32	Resistente
<i>K. pneumoniae</i>	1.33A	>4	32	16	Resistente
<i>K. pneumoniae</i>	2.6A	2	1	0,5	Sensível
<i>K. pneumoniae</i>	2.16C	2	1	0,5	Sensível
<i>K. pneumoniae</i>	3.5A	2	2	0,5	Sensível
<i>K. pneumoniae</i>	3.3A	2	0,5	0,5	Sensível
<i>K. pneumoniae</i>	3.19A	2	1	0,5	Sensível
<i>K. pneumoniae</i>	4.3A	>4	64	16	Resistente
<i>K. pneumoniae</i>	4.4A	2	1	0,5	Sensível
<i>K. pneumoniae</i>	5.25A	>4	32	16	Resistente
<i>K. pneumoniae</i>	5.33A	2	2	0,5	Sensível
<i>K. pneumoniae</i>	5.36A	2	2	0,5	Sensível
<i>E. aerogenes</i>	2.19A	2	1	0,5	Sensível
<i>E. aerogenes</i>	3.14A	>4	32	16	Resistente
<i>E. cloacae</i>	3.9A	4	16	8	Resistente
<i>E. aerogenes</i>	3.3C	>4	32	8	Resistente
<i>E. aerogenes</i>	3.2C	>4	32	8	Resistente

Um isolado é considerado resistente às polimixinas quando CIM >2 µg/mL. * Foi considerado resistente pela metodologia de microdiluição em caldo, sendo sensível pela disco-eluição.

O estudo que propôs essa metodologia encontrou uma concordância categórica e essencial de 98% e 99%, respectivamente, em comparação com a microdiluição em caldo. Assim como em nosso estudo, erros muito graves (*very major error*) ocorreram para os isolados de *E. coli* produtoras de *mcr-1*. Dos 6 isolados testados, 3 deles apresentaram resultado sensível (CIM=2 µg/mL) na disco-eluição e na microdiluição foram resistentes (CIM = 4 µg/mL). Com isso, o estudo sugere que isolados com CIM de 2 devam ser confirmados com microdiluição em caldo e avaliados quanto à presença de genes *mcr-1* (SIMNER, BERGMAN, *et al.*, 2018). Porém, em nosso estudo

tivemos 3 controles de *E.coli mcr-1* positivas com CIM<1 e com resultado resistente na microdiluição em caldo. Já para as outras amostras com CIM=2, o resultado sensível também foi encontrado na microdiluição.

Apesar desses resultados com algumas amostras de *mcr-1*, a comparação dessas técnicas para outras bactérias teve 100% de concordância. Simner e colaboradores, encorajam o uso desse simples teste em isolados de Enterobactérias, *A. baumannii* e *P. aeruginosa* que possuem resistência cromossômica às polimixinas, o mecanismo que ainda é o mais comum para essa resistência. Como o teste de disco-eluição requer somente disco de polimixina E e caldo Mueller-Hinton, laboratórios com recurso limitados em locais que utilizam muito a polimixina, esse teste pode ser adequado no lugar de não se fazer nenhum teste (SATLIN, 2018, SIMNER, BERGMAN, *et al.*, 2018).

Os resultados são interessantes, mas as limitações desse teste merecem atenção. É desejável que um estudo avalie uma grande quantidade de isolados incluindo também mais isolados com *mcr-1*, dessa forma, a porcentagem de erros muito graves provavelmente será menor, visto que a quantidade de enterobactérias com *mcr-1* ainda é baixa, com 3% no mundo (SATLIN, 2018, WISE, ESTABROOK, *et al.*, 2018). A performance baixa em isolados com *mcr-1* não é considerada uma surpresa, visto que esses isolados geralmente apresentam uma CIM de 2 a 4 µg/mL, valores que são próximos do ponto de corte (CHEW, LA, *et al.*, 2017). Porém, para os quatro controles de *E. coli mcr-1* testados no presente estudo, a CIM ficou entre 8 e 16 µg/mL não sendo um valor próximo do ponto de corte como citado na literatura. Esses resultados foram repetidos e confirmados por várias vezes, pois sempre que era feito o teste para uma quantidade de isolados o controle de *E. coli mcr-1* também era testado, apresentando sempre a mesma CIM.

Outro ponto que deve ser levado em consideração é a diferença entre a polimixa E e a polimixina B. O perfil farmacocinético/farmacodinâmico da polimixina B é mais favorável e menos nefrotóxica que a polimixa E quando usado na clínica. Estudos mostram uma concordância de quase 99% entre as duas polimixinas para bactérias Gram-negativas, nos quais um terço dos isolados resistentes à polimixina E possuem uma CIM mais alta do que com polimixina B (SADER, RHOMBERG, *et al.*, 2015). Nosso estudo corrobora com essas informações, em que a CIM da polimixina E foi uma ou duas vezes mais alta que da polimixina B (Tabela 2), porém essa diferença não afetou no resultado final do perfil desses isolados, sendo todos classificados como resistentes.

Um estudo do Brasil avaliou a disco-eluição fazendo uma interessante adaptação na técnica para que se tornasse uma micro disco-eluição, utilizando uma quantidade de meio de cultura muito menor, assim como de discos de colistina. Para eles, os testes foram satisfatórios para as enterobactérias e não para os não-fermentadores. Uma limitação do teste indicada pelos autores foi o número restrito de não-fermentadores. Dessa forma, o grupo indicou mais testes para essas espécies (DALMOLIN, MAZZETTI, *et al.*, 2020).

Devido à repercussão dessa metodologia e a necessidade de mais testes, o CLSI, em novembro de 2019, publicou um estudo multicêntrico para avaliação da performance do teste de disco-eluição. Foram utilizados 270 isolados de enterobactérias, 122 de *P. aeruginosa* e 106 de *Acinetobacter* spp. No geral, 94,4% dos resultados do teste de disco-eluição estavam em concordância essencial¹ e 97,9% em concordância categórica² com as CIM do teste de referência de microdiluição em caldo. A maioria dos erros entre as espécies de *E. coli* ocorreram em amostras com o gene *mcr-1*, foram 4 amostras e 3 delas possuíam o gene. Como já mencionado, isolados com esse gene de resistência, já são conhecidas por terem CIM que ficam próximo aos pontos de corte, gerando erros nesse tipo de teste (HUMPHRIES, GREEN, *et al.*, 2019).

Após todos os testes entre laboratórios e controle de qualidade rigorosos, o CLSI aprovou provisoriamente o teste de disco difusão em caldo para enterobactérias e *P. aeruginosa*, mas ainda não foi recomendado para *A. baumannii* devido às taxas de erros encontradas (5,6% de erros muito graves, em que é encontrado um resultando sensível quando na verdade é resistente) e o grande número de isolados que foram excluídos da análise devido à falta da CIM de referência, sendo preciso mais testes para essa espécie. O *status* de provisório também se dá ao fato da necessidade de testes com mais de uma marca de discos de antimicrobianos e de caldo Mueller-Hinton cátion-ajustado e outros tópicos que são necessários para uma aprovação completa. No entanto, dada a necessidade clínica global, o comitê de avaliação não quis adiar a publicação dos resultados e aprovou o teste. Vale informar ainda, que nesse mesmo estudo foi avaliada outra metodologia, a de ágar diluição, que também foi aprovada (HUMPHRIES, GREEN, *et al.*, 2019).

Em janeiro de 2020, na 30ª edição do documento CLSI M100, foram publicados os 3 testes aprovados para polimixina E, a microdiluição em caldo (método referência), a disco-eluição em caldo e ágar diluição, para espécies de enterobactérias e *P. aeruginosa*. Para o CLSI, a

¹ Concordância essencial: é quando a CIM obtida entre as metodologias comparadas variam ± 1 diluição.

² Concordância categórica: é quando a CIM obtida pela comparação de diferentes metodologias encontram-se em uma mesma categoria de sensibilidade. Ideal é que tenha uma taxa $\geq 90\%$.

polimixina E e a polimixina B são consideradas agentes equivalentes, portanto, as CIM obtidas nos testes com colistina podem ser extrapoladas para a polimixina B e vice-versa. Até o momento, o CLSI não avaliou os métodos de teste da polimixina B e os dois testes aprovados não devem ser adaptados à polimixina B (CLSI, 2020). Para polimixina B, só existe comercialmente o disco com concentração de 30 µg, sendo inviável aprovar o mesmo método de disco-eluição, pois precisaria utilizar 3 vezes mais a quantidade de caldo Mueller-Hinton utilizada na metodologia.

Outro ponto que foi chamado a atenção, caso o laboratório venha utilizar esse método, é um padrão inconsistente de crescimento que pode aparecer, o não crescimento em 2 µg/mL e o crescimento em 1 µg/mL e 4 µg/mL. O teste deve sempre ser repetido para avaliar se não houve um problema na execução. Essa inconsistência pode ser devido a contaminação, heteroresistência, concentração inadequada de antimicrobiano nos tubos e erro na hora de inocular os tubos com a suspensão de bactéria (CLSI, 2020). Em nossas amostras, um padrão inconsistente apareceu em algumas amostras, após a repetição, esse problema foi resolvido.

Para *A. baumannii*, a disco-eluição também foi utilizada, pois foi realizada antes da publicação do CLSI que não recomenda a utilização para essa espécie, por enquanto. Para todos os 61 *A. baumannii*, o resultado foi sensível na disco-eluição, não sendo conferido com a microdiluição em caldo. Esses resultados não foram utilizados para nenhuma classificação.

4.3 DETECÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA

Foram pesquisados 19 genes que codificam mecanismos enzimáticos de resistência aos antimicrobianos, são eles: *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} grupos 1, 2, 8 e 9, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{GES}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-58}, *bla*_{OXA-143}, *bla*_{SPM-1} e *mcr-1*.

A técnica de PCR em tempo real foi utilizada de forma qualitativa ao invés da PCR tradicional de ponto final por ser uma técnica mais sensível e específica. Com essa técnica pode-se acompanhar o resultado em tempo real à medida que o aparelho detecta a fluorescência produzida em cada amostra. Trata-se de uma variação da PCR tradicional na qual a amplificação e detecção ocorrem simultaneamente, dispensando a eletroforese em gel de agarose para visualização dos produtos amplificados (WILLIAMS, 2009).

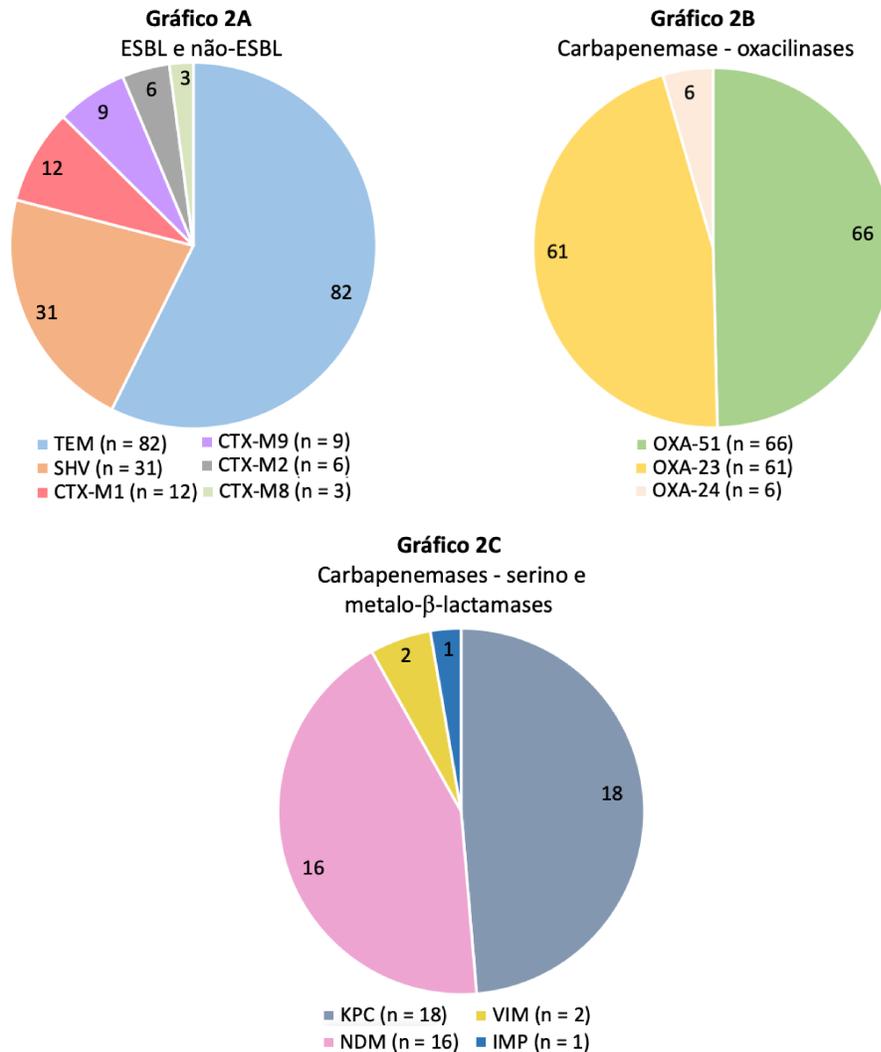
Apesar dos iniciadores terem sido desenhados tomando-se o devido cuidado para não apresentarem dímeros, que podem formar produtos inespecíficos e levar a leituras errôneas, optou-se também por adicionar a curva de *melting* ao final da reação. Dessa forma, é possível fazer uma

comparação da temperatura de *melting* entre os produtos das amostras e o produto dos controles positivos de cada gene que é adicionado em cada placa. Como os produtos de dímeros dos iniciadores são geralmente mais curtos do que o produto alvo, é possível reconhecer facilmente analisando a curva de *melting*. A temperatura de *melting* para os dímeros será mais baixa do que para o produto de interesse, assim a avaliação do resultado final será mais seguro (KUBISTA, ANDRADE, *et al.*, 2006). Além disso, o tempo de realização utilizando o protocolo do tipo *fast*, disponível no aparelho StepOnePlus utilizado, é de uma hora e vinte minutos para uma placa de 96 poços, sendo mais rápido do que na PCR tradicional de ponto final.

As reações de PCR para os genes de resistência foram feitas igualmente para as 4 espécies, sempre em triplicata e com adição de controle positivo e negativo em todas as placas.

De uma forma geral, sem avaliar cada espécie de bactéria, obtivemos amostras positivas para 13 dos 19 genes pesquisados entre os 153 isolados de janeiro de 2018 a janeiro de 2019. Os genes mais encontrados foram de β -lactamases do tipo ESBL, β -lactamases não-ESBL e carbapenemases do tipo oxacilinas. Entre as β -lactamases ESBL e não-ESBL a mais detectada foi a do tipo TEM em 82 isolados, seguida da β -lactamases SHV com 31 isolados (Gráfico 2A). Já entre as carbapenemases do tipo oxacilinas, as mais detectadas foram OXA-51 e OXA-23 com 66 e 61 isolados, respectivamente (Gráfico 2B). Entre as serino e metalo- β -lactamases o gene *bla_{KPC}* foi encontrado em 18 amostras e o gene *bla_{NDM}*, em 16 amostras (Gráfico 2C). Os demais genes tiveram um menor número de isolados positivos.

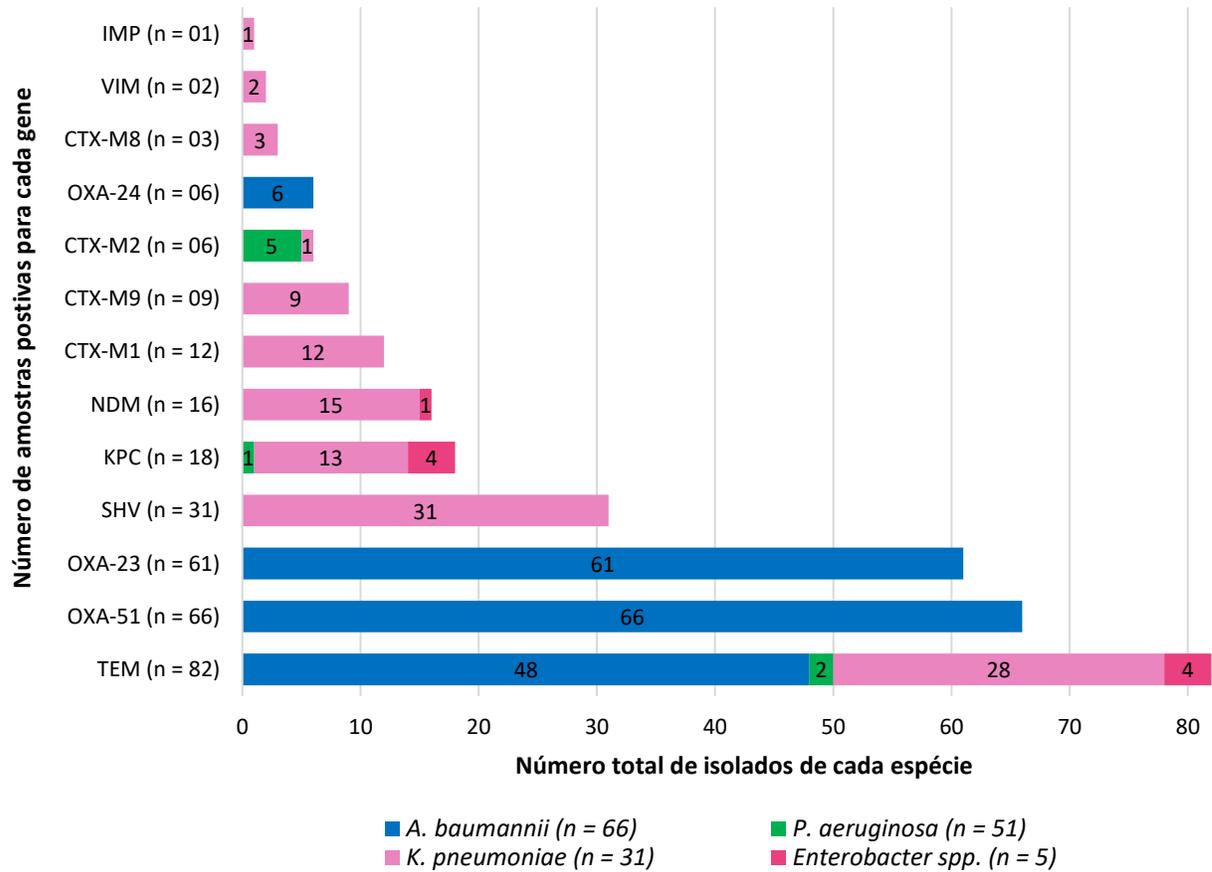
Gráfico 2. Relação dos 13 genes de resistência encontrados divididos entre os grupos de β -lactamases.



Fonte: elaborado pela autora.

Avaliando cada gene e associando com as 4 espécies de bactérias, percebemos que a espécie *K. pneumoniae* é a que mais tem genes de resistência diferentes, totalizando 10 tipos. Esse resultado já era esperado, pois já se conhece a facilidade e propensão com que essa espécie tem para aquisição de genes de resistência distintos e adquiridos de várias formas (PIPERAKI, SYROGIANNOPOULOS, *et al.*, 2017). O gene *bla*_{TEM} foi o único presente nas 4 espécies de bactérias, com prevalência maior entre *A. baumannii* com 48 isolados, seguido de *K. pneumoniae* com 28, *P. aeruginosa* com 2 e *Enterobacter* spp. com 4 (Gráfico 3).

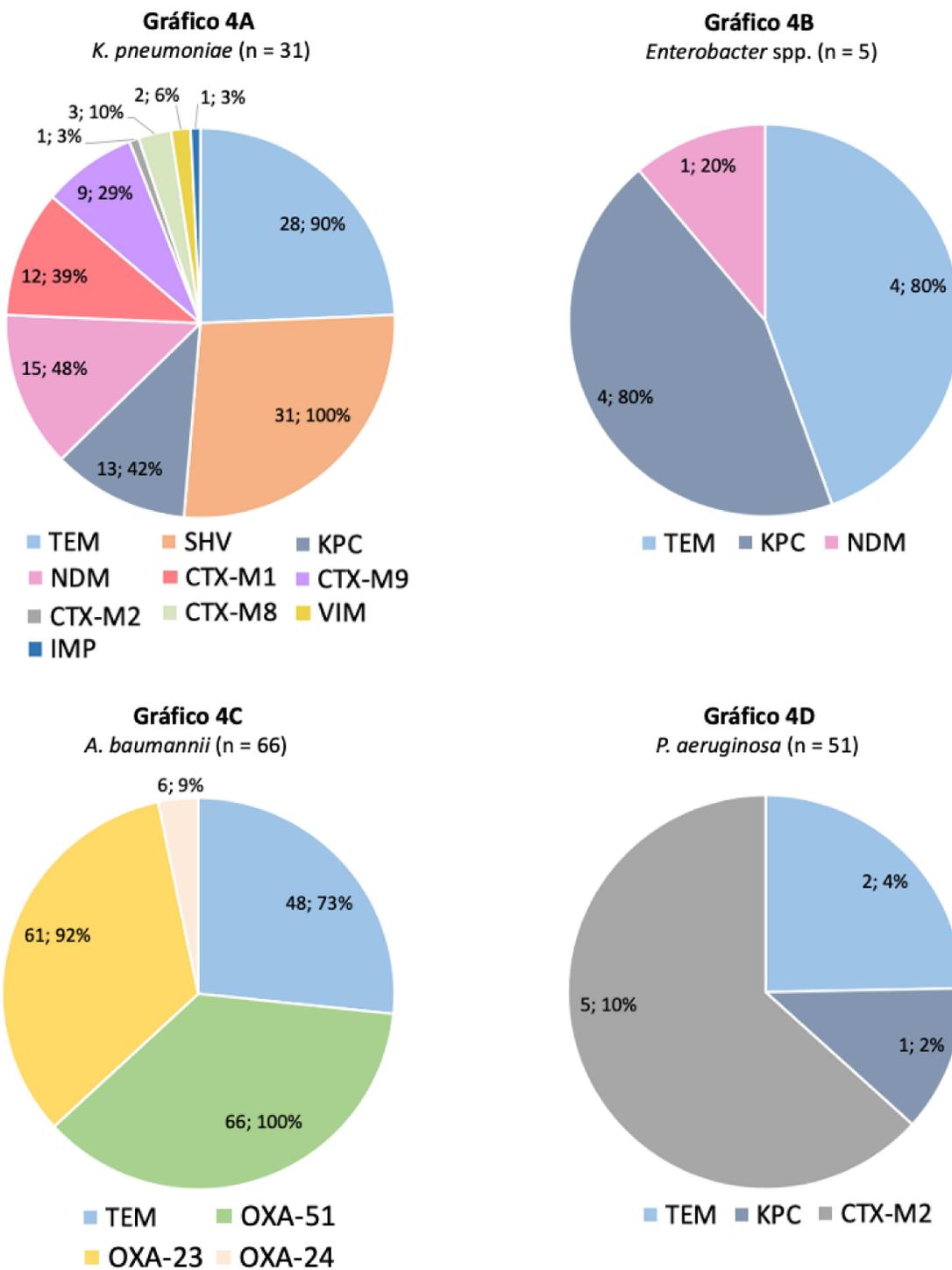
Gráfico 3. Relação dos 13 genes de resistência encontrados entre os 153 isolados, associados com as 4 espécies de bactérias.



Fonte: elaborado pela autora.

O Gráfico 4 apresenta uma melhor visualização dos genes de resistência encontrados, agora com enfoque em cada uma das 4 espécies de Gram-negativas do grupo ESKAPE, mostrando as taxas encontradas em cada uma dessas espécies. O gene mais encontrado em *K. pneumoniae* foi *bla_{SHV}* (100%), em *Enterobacter* spp. foi *bla_{TEM}* e *bla_{KPC}* (ambos com 80% de positividade), em *A. baumannii* 100% dos isolados foram positivos para *bla_{OXA-51}* e em *P. aeruginosa* o *bla_{CTX-M2}* foi o mais encontrado com 10%.

Gráfico 4. Relação de cada uma das 4 espécies de bactérias com os genes de resistência encontrados, mostrando a taxa de positividade para cada gene.



Fonte: elaborado pela autora.

Os resultados e discussões continuarão a ser apresentados baseados nos 3 gráficos apresentados (Gráficos 2, 3 e 4), porém serão abordados separadamente por cada tipo de genes de resistência: ESBLs e não-ESBL (TEM, SHV, CTX-M1-2-8-9), carbapenemase KPC (serino- β -lactamase), carbapenemase NDM (metalo- β -lactamase) e oxacilinas (OXA-51, OXA-23 e OXA-24). Dessa forma, a discussão irá associar cada grupo de genes de resistência com seus respectivos genes e com as espécies de bactérias estudadas.

As primeiras enterobactérias foram detectadas como portadoras de genes que codificam para ESBL em 1980. À época, as ESBL mais encontradas eram as do tipo TEM e SHV. A partir dos anos 90, as ESBL do tipo CTX-M começaram a ter uma maior prevalência. As enzimas do tipo ESBL são capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas até a quarta geração e monobactâmicos. Nos laboratórios de microbiologia clínica, a detecção da produção de ESBL é definida pela redução da sensibilidade a um ou mais dentre estes antimicrobianos: ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona ou aztreonam; e pelo aumento da atividade desses agentes na presença de ácido clavulânico, que é um inibidor de β -lactamases. As maiores taxas desses genes são encontradas em países em desenvolvimento, porém em países desenvolvidos as taxas começaram a aumentar significativamente (DOI, IOVLEVA, *et al.*, 2017, PEIRANO, PITOUT, 2019).

No Brasil, os primeiros relatos publicados de ESBL foram em 1997, nos quais foram encontrados em 72 amostras clínicas de *K. pneumoniae* (GALES, BOLMSTRÖM, *et al.*, 1997). Já o primeiro relato no Brasil de um estudo utilizando detecção molecular de ESBL, foi no ano 2000 e na época o gene mais predominante foi o *bla*_{CTX-M8} (BONNET, SAMPAIO, *et al.*, 2000).

Um estudo que revisou todas as publicações do Brasil sobre ESBL até o ano de 2016, mostrou que CTX-M2 foi a mais frequente enzima encontrada em diferentes espécies de enterobactérias (SAMPAIO, GALE, 2016). Entretanto, esse dado está em discordância com nosso estudo, em que a CTX-M2 não foi encontrada em nenhuma das enterobactérias, sendo somente detectado em 5 amostras da espécie *P. aeruginosa*.

As amostras de Santa Catarina parecem estar em desacordo com os resultados encontrados no Brasil, em se tratando de detecção de β -lactamases do tipo ESBL. Como mencionado, CTX-M2 é a ESBL mais prevalente no Brasil, mas no presente estudo não foi encontrada entre *K. pneumoniae* e *Enterobacter* spp., as duas espécies do estudo que são enterobactérias. A β -lactamase mais predominante entre essas 2 espécies foi a TEM, com 32 amostras positivas, 28 delas em *K. pneumoniae* e 4 em *Enterobacter* spp., tendo uma taxa de 90% entre *K. pneumoniae* e 80% entre

Enterobacter spp. (Gráfico 4A e 4B). A segunda β -lactamase mais encontrada foi a SHV com 31 amostras positivas e todas pertencentes à espécie *K. pneumoniae*, tendo uma taxa de 100% nessa espécie (Gráfico 4A), esse dado corrobora com os dados do Brasil, onde a segunda β -lactamase mais encontrada é a do tipo SHV (DA NOGUEIRA, CONTE, *et al.*, 2015). Entre as β -lactamases do tipo CTX-M, a mais prevalente foi a CTX-M do grupo 1 com 12 amostras, seguida da CTX-M9 com 9 amostras e CTX-M8 com 3, todas detectadas em amostras de *K. pneumoniae* (Gráfico 4A). A CTX-M2, como já mencionado, foi encontrada somente em 5 amostras de *P. aeruginosa* (Gráfico 4D).

Nos EUA os genes *bla_{SHV}* e *bla_{TEM}* são mais raros, onde aproximadamente 10% das ESBL são do tipo SHV e o tipo TEM, é considerado bastante incomum. Esses genes já foram mais prevalentes na década de 80, mas hoje as β -lactamases mais comuns são as do tipo CTX-M como na maioria dos países (DOI, IOVLEVA, *et al.*, 2017).

A ESBL do tipo CTX-M mais predominantes mundialmente é a CTX-M15, que pertence ao grupo do CTX-M1, seguido da CTX-M14 (pertencente ao grupo do CTX-M9). O CTX-M2, parece ser limitado geograficamente, sendo mais comum na América do Sul e Japão, da mesma maneira o CTX-M8, sendo mais encontrado na América do Sul (DOI, IOVLEVA, *et al.*, 2017).

Os dados do presente estudo corroboram com outro do nosso grupo, também de Santa Catarina, que foi realizado em 2014 com amostras de enterobactérias isoladas de pacientes do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU-UFSC/SC). Nesse estudo de 2014, as ESBL mais prevalentes também não foram as do tipo CTX-M. A mais predominante foi a ESBL do tipo SHV (60%), todas detectadas em enterobactérias, seguida da CTX-M1 que também foi a CTX-M mais encontrada. Isso reforça que as amostras de Santa Catarina parecem ter características distintas da maioria das amostras do Brasil (ZAMPARETE, 2014).

A CTX-M2, não foi encontrada nas amostras de enterobactérias pesquisadas, porém, foi encontrada em 5 bactérias não-fermentadoras da glicose, ambas da espécie *P. aeruginosa*. Em estudo feito com 720 amostras de *P. aeruginosa* em um hospital do Brasil, a ESBL mais detectada foi a CTX-M2, com 19,6% nessa espécie (POLOTTO, CASELLA, *et al.*, 2012). Outro gene encontrado no presente estudo foi o *bla_{TEM}*, detectado em 2 amostras de *P. aeruginosa*, acredita-se que tanto o gene *bla_{CTX-M2}* como *bla_{TEM}* encontrados em *P. aeruginosa* podem ser resultado da transferência desses genes provenientes das enterobactérias (PICÃO, POIREL, *et al.*, 2009) e,

dessa forma, passam a ser um reservatório desse tipo de gene de resistência contribuindo para surtos que venham a ocorrer em hospitais (DUBOIS, ARPIN, *et al.*, 2005).

O gene *bla*_{TEM} também foi encontrado em 48 amostras entre os 66 isolados de *A. baumannii*, tendo uma taxa de 73% nessa espécie (Gráfico 4C). As 4 classes de β -lactamases já foram identificadas em *A. baumannii* e estudos mostram que essa espécie tem uma competência natural para incorporar DNA exógenos, tendo em seu genoma uma presença grande de DNA externo, implicando em transferência horizontal bastante frequente (TRAGLIA, CHUA, *et al.*, 2014). Em *A. baumannii* já foram identificados tanto β -lactamases do tipo TEM, que são não-ESBL (como a TEM-1) como as consideradas ESBL (TEM-92, TEM-3). Nossos iniciadores foram desenhados para contemplar o maior número de tipos do gene *bla*_{TEM}, não fazendo essa diferenciação. O primeiro relato de TEM-92 foi feito em 2007, mostrando que esse gene confere resistência de amplo espectro aos β -lactâmicos (ENDIMIANI, LUZZARO, *et al.*, 2007).

Já o TEM-1 que é não-ESBL, confere resistência de menor espectro, porém confere uma importante resistência ao antimicrobiano sulbactam que é um dos poucos antimicrobianos considerados como opção para o tratamento de *A. baumannii* MDR. Estudos mostram que a utilização do sulbactam sozinho ou associado com ampicilina ou cefoperazona, é capaz de combater um grande número de *A. baumannii* MDR com resistência aos carbapenêmicos e também às polimixinas. Já outros estudos, mostram que a taxa de cura utilizando diferentes dosagens desse antimicrobiano não foi satisfatória. Porém, devido ao crescente aumento da resistência ao sulbactam, mais dados clínicos devem ser avaliados para determinar a melhor dosagem de sulbactam para tratar infecções severas por *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos (VILA, PACHÓN, 2012). Por isso, a presença do gene TEM-1 que confere resistência ao sulbactam é bastante preocupante e cada vez mais estudos têm encontrado isolados MDR positivos para TEM-1 (BEN, YANG, *et al.*, 2011, NEMEC, KŘÍŽOVÁ, *et al.*, 2008). Em estudo que avaliou a presença do gene em amostras coletadas durante 2 décadas (1991 a 2011), mostrou uma relação entre a presença do gene e a resistência ao sulbactam (KRIZOVA, POIREL, *et al.*, 2013). Essa relação do gene *bla*_{TEM} com resistência a sulbactam apareceu em nosso trabalho, entre os 48 isolados positivos para o gene *bla*_{TEM} 25 apresentaram resistência à ampicilina/sulbactam, porém também foram observados 27 isolados sensíveis para esse antimicrobiano que apresentaram o gene *bla*_{TEM}. Seria necessário o sequenciamento dos produtos de PCR para determinar a variante gênica.

Entre os 66 isolados de *A. baumannii* do presente estudo, todos foram positivos para o gene intrínseco da espécie, o *bla*_{OXA-51}, 92% (n = 61) apresentaram *bla*_{OXA-23} e 9% (n = 6) o gene *bla*_{OXA-24} (Gráfico 4C). Entre os 6 isolados com o gene *bla*_{OXA-24}, 5 pertenceram a mesma região e mesmo hospital (região 3, hospital A) e foram classificados como MDR, enquanto que o sexto isolado, além do *bla*_{OXA-24}, também apresentou o *bla*_{OXA-23}, sendo classificado como XDR, possível PDR (região 5, hospital A).

Os genes da classe D, que codificam as carbapenemases do tipo oxacilinasas (OXA-23, -51, -24, -143 e -58), são geralmente encontrados em *A. baumannii*. As oxacilinasas OXA-23, OXA-58 e OXA-143 são as mais encontradas na América Latina nessa espécie (LABARCA, SALLES, *et al.*, 2016). O grupo OXA-23-like é o mais disseminado e prevalente na África, América Latina e leste e sudeste da Ásia (EVANS, AMYES, 2014). O primeiro relato de *A. baumannii* OXA-23 foi em 1985 na Escócia, na época a enzima foi chamada de ARI-1 (*Acinetobacter resistant to imipenem*) (PATON, MILES, *et al.*, 1993). Curiosamente, o primeiro relato de OXA-23 foi no mesmo ano (1985) que foi aprovado o primeiro carbapenêmico para uso na clínica, o imipenem (LYON, 1985).

A enzima OXA-72 (da família OXA-24) foi identificada pela primeira vez na Tailândia em 2004 e, posteriormente, encontrada em isolados da China, Coreia do Sul, Taiwan, Itália, Espanha e França. Já no Brasil, o primeiro isolado foi no ano de 2007 (WERNECK, PICAIO, *et al.*, 2011). O primeiro surto relacionado com isolados da família OXA-24 da América do Sul foi no Equador, onde os 33 *A. baumannii* eram de 2 centros médicos e foram isolados no ano 2013 (NUÑEZ QUEZADA, RODRÍGUEZ, *et al.*, 2017).

No Brasil, o gene *bla*_{OXA-23} tem sido associado com dois complexos clonais: CC79 e CC15. Pagano e colaboradores detectaram uma disseminação desses mesmos clones carregando *bla*_{OXA-72} em 3 estados brasileiros, São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul, no ano de 2013. Na época foi o primeiro relato do complexo clonal CC15 associado com o gene *bla*_{OXA-72}, enquanto que o CC79 associado a esse gene já havia sido documentado na Argentina (PAGANO, ROCHA, *et al.*, 2017). Isolados de *A. baumannii* com enzima da família OXA-24 ainda são pouco descritos no Brasil e no estado de Santa Catarina não há relatos de publicação.

Em um estudo que avaliou 163 isolados de três centros de UTI do Irã, observaram uma taxa de 85% para o gene *bla*_{OXA-23} e uma coprodução dos genes *bla*_{OXA-23} e do gene *bla*_{OXA-40} em 55% dos isolados classificados como XDR. A oxacilina OXA-40 faz parte da família da OXA-

24. Também observaram que os isolados que apresentavam duas oxacilinases tiveram um aumento na CIM para os carbapenêmicos (RANJBAR, FARAHANI, 2019). Lima e colaboradores avaliaram 17 estudos de *A. baumannii* totalizando 1.226 isolados (2003 a 2015), a taxa de *bla*_{OXA-23} variou de 65% a 100% e de *bla*_{OXA-24/40} de 3,7% a 100% (LIMA, SILVA ALVES, *et al.*, 2019).

Entre as β -lactamases do tipo carbapenemase (serino- β -lactamases), a KPC foi a mais encontrada, com 18 amostras positivas, 13 em *K. pneumoniae*, tendo uma taxa de 42% entre as amostras dessa espécie, 4 (80%) entre as 5 amostras de *Enterobacter* spp. e 1 amostra de *P. aeruginosa* (Gráfico 3 e 4). Essa enzima é capaz de hidrolisar os carbapenêmicos, penicilinas, todas as cefalosporinas, monobatâmicos e até inibidores de β -lactamases, como o clavulanato. Desde sua primeira identificação em 1996, enzimas codificadas por genes do tipo KPC (especialmente KPC-2) têm-se disseminado no mundo todo, sendo consideradas endêmicas em muitos países, inclusive no Brasil, onde o primeiro relato foi em 2006. Entre as carbapenemases mais prevalentes (KPC-2, KPC-3, NDM, OXA-23, OXA24/40 e OXA-48), a KPC é considerada a enzima mais difundida no mundo e sua produção em *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos é o mecanismo de resistência mais frequente encontrado com taxas de até 96% (MUNOZ-PRICE, POIREL, *et al.*, 2013, SAMPAIO, GALES, 2016).

Estudos têm encontrado uma relação entre a resistência às polimixinas e isolados produtores de *bla*_{KPC}. Um estudo que avaliou amostras de vários estados do Brasil encontrou uma taxa de 15% de resistência à polimixina B em *K. pneumoniae* produtora de *bla*_{KPC} (PEREIRA, DE ARAUJO, *et al.*, 2013). Em São Paulo, um estudo que avaliou 3.085 isolados encontrou um aumento de *K. pneumoniae* carbapenem-resistente de 35,5% no ano de 2015 e uma elevação da resistência às polimixinas em *K. pneumoniae* com *bla*_{KPC}, de 0% em 2011 para 27% em 2015 (BARTOLLETTI, SECO, *et al.*, 2016). No presente estudo também foi encontrada essa relação entre as enterobactérias resistentes às polimixinas, em que 6 de 9 isolados de *K. pneumoniae* eram produtores do gene *bla*_{KPC} e 3 de 4 *Enterobacter* spp. eram positivos para *bla*_{KPC}.

A disseminação global de *K. pneumoniae* produtora de KPC é considerada grave, se não o mais importante problema de saúde pública relacionado com IRAS no mundo. Essa resistência está sempre relacionada a altas taxas de morbimortalidade em pacientes com infecções por esse patógeno (AIRES, PEREIRA, *et al.*, 2020).

A enzima KPC é predominante em enterobactérias, principalmente em *K. pneumoniae*, mas também é encontrada em não-fermentadores da glicose, apesar de mais raro (BARNES,

WINKLER, *et al.*, 2017), como é o caso da amostra que foi encontrada em *P. aeruginosa* no presente estudo. A resistência aos carbapenêmicos nessa espécie é principalmente por diminuição na expressão de porinas ou pela aquisição de carbapenemases como a KPC, IMP, VIM, GES ou SPM (BOTELHO, GROSSO, *et al.*, 2019, MIRANDA, DE FILIPPIS, *et al.*, 2015, NAAS, BONNIN, *et al.*, 2013). O primeiro relato de KPC-2 em *P. aeruginosa* foi na Colômbia no ano de 2007 (VILLEGAS, LOLANS, CORREA, KATTAN, LOPEZ, QUINN, 2007) e, no Brasil, foi em 2008, encontrado em uma amostra de um paciente do Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná/Universidade Estadual de Londrina (HU-UDEL/PR), o isolado foi classificado como XDR assim como o do presente trabalho (DE PAULA-PETROLI, CAMPANA, *et al.*, 2018).

Em nosso estudo o gene *bla_{NDM}* foi encontrado somente entre as enterobactérias, com 16 amostras positivas, tendo uma taxa de 42% entre as amostras de *K. pneumoniae* (n = 15), e somente uma amostra positiva em *Enterobacter* spp (20%).

A NDM é outra carbapenemase considerada um grave problema de saúde pública. A principal disseminação do gene responsável por essa resistência ocorre de forma horizontal entre as bactérias. Esse tipo de transferência facilita a combinação dos mais diferentes e eficientes genes de resistência a múltiplas drogas em diversos tipos de plasmídeos, que são facilmente compartilhados entre espécies diferentes de bactérias. Diferente da KPC em que clones epidêmicos são a principal razão de sua disseminação, em NDM é explicado pela transferência horizontal de plasmídeos em uma ampla gama de hospedeiros (PESESKY, HUSSAIN, *et al.*, 2015). A CIM para carbapenêmicos na presença do *bla_{NDM}* é geralmente maior do que de outras carbapenemases, limitando a utilização desses antimicrobianos em associação e/ou em doses mais elevadas na prática clínica (DORTET, POIREL, *et al.*, 2014, RAHMAN, SHUKLA, *et al.*, 2014).

O gene *bla_{NDM}* foi descrito mais recentemente, no ano de 2009. No Brasil, foi encontrado em 2012 em um isolado de *Acinetobacter pittii* na cidade de Joinville no estado de Santa Catarina, esse estudo foi publicado no ano de 2019 e passou a ser o primeiro isolado onde o gene *bla_{NDM}* foi encontrado no Brasil, afirmando que esse gene estava no Brasil antes do relato de 2013 da cidade de Porto Alegre/RS, que era considerado o primeiro isolado com o gene *bla_{NDM}*, que foi encontrado na espécie de *P. rettgeri* (CARVALHO-ASSEF, PEREIRA, *et al.*, 2013, DEGLMANN, KOBBS, *et al.*, 2019). No mesmo ano do relato de Porto Alegre/RS, foi realizada uma outra pesquisa em 1.134 isolados de 17 hospitais da mesma cidade para avaliar a disseminação do gene *bla_{NDM}*, sendo encontrados 11 isolados positivos para *bla_{NDM}* em 9 *Enterobacter* spp. e em 2 *Morganella*

morganii, sendo que 6 *Enterobacter* spp. foram recuperados da mesma instituição onde o caso de NDM foi encontrado na espécie de *P. rettgeri* (ROZALES, RIBEIRO, *et al.*, 2014). Esse gene tem sido reportado em vários estados brasileiros, mas não é tão disseminado quanto o gene *bla*_{KPC} (SAMPAIO, GALES, 2016). O gene *bla*_{NDM} é a carbapenemase mais comum no sul da Ásia (Índia, Paquistão e Bangladesh), mas também tem emergido na China e nos EUA nos quais antes apareciam como relatos esporádicos (IOVLEVA, DOI, 2017). Em 2017 no Rio de Janeiro, das 16 *K. pneumoniae* produtoras de NDM encontradas, todas foram consideradas não-clonais inclusive com perfil de sensibilidade diferentes (AIRES, PEREIRA, *et al.*, 2017). Esses resultados confirmam a ideia de que o gene *bla*_{NDM} tem uma grande capacidade de transmissão horizontal com disseminação rápida em espécies diferentes de bactérias.

Alguns isolados chamam a atenção pois carregam múltiplos genes de resistência. A *K. pneumoniae* é a espécie que possui mais genes de resistência diferentes, algumas com até 5 genes. Os isolados 1.4A e 5.5B apresentaram 5 genes de resistência, sendo duas carbapenemases (KPC e NDM), sendo eles: *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-MI}. O isolado 2.16C também apresentou 5 genes sendo duas carbapenemases (NDM e VIM): *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-MI}. Como já comentado, em *A. baumannii* encontramos um isolado com a presença de duas oxacilinases (OXA-23 e OXA-24).

Essas amostras são interessantes e algumas foram escolhidas para o sequenciamento completo, para entender como esses genes estão alocados no genoma dessas bactérias, se compartilham ou não um mesmo plasmídeo, e a capacidade conjugativa dos mesmos.

Como já mencionado, todas as amostras selecionadas para este estudo possuem resistência aos carbapenêmicos e devem, portanto, possuir determinantes genéticos de resistência que possam explicar esse fenótipo. Entretanto, 3 *K. pneumoniae* apresentaram somente genes de resistência para ESBL, não explicando o seu fenótipo de resistência aos carbapenêmicos, sugerindo que essas amostras podem ter outros genes que não foram pesquisados neste estudo ou apresentam resistência por outro mecanismo que não seja o enzimático. Dentre esses 3 isolados, 2 apresentaram os genes *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M9} (1.33A e 2.8A), sendo um deles resistente às polimixinas (1.33A), e o terceiro isolado (5.25A) apresentou os genes *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-MI}, sendo também resistente às polimixinas. Em *P. aeruginosa*, como já era esperado pelas características de resistência dessa espécie, somente um isolado apresentou uma carbapenemase (KPC) explicando o seu fenótipo de resistência aos carbapenêmicos. Nessa espécie, os principais mecanismos de resistência aos

carbapenêmicos são a combinação de AmpC, mudança na expressão de porinas e superexpressão de bombas de efluxo que podem levar a níveis elevados de resistência na ausência de carbapenemases (PANG, RAUDONIS, *et al.*, 2019).

Em relação aos dados epidemiológicos de Santa Catarina, na Nota Técnica 01/2016/CECISS/LACEN (LACEN/CECISS, 2016) há dados referentes a alguns genes de resistência e surtos notificados no estado no ano de 2015 e no primeiro semestre de 2016, não possuindo dados do período de janeiro de 2018 a janeiro de 2019, no qual os isolados do presente estudo foram obtidos. O total de cepas isoladas e identificadas como MDR foi de 1.578 (Gram-negativas e positivas) com 56 surtos notificados. Entre os surtos, foram 12 por *K. pneumoniae* com *bla_{KPC}*, 2 *K. pneumoniae* resistente às polimixinas, 4 de *P. aeruginosa* *bla_{SPM}*, 7 por *A. baumannii* com *bla_{OXA-23}*. Ainda nessa nota técnica em alguns surtos não foram identificados a espécie da bactéria: 5 surtos por *bla_{NDM}*, 2 por *bla_{VIM}* e 10 por *bla_{SPM}* e *bla_{VIM}*.

Como alguns isolados apresentaram resistência às polimixinas foi realizada a metodologia de *multiplex* PCR para detecção das variantes do gene *mcr* (1, 2, 3, 4 e 5) que conferem resistência por meio de plasmídeos (JOUSSET, BERNABEU, *et al.*, 2019). O gene *mcr-1* já havia sido pesquisado pela metodologia de PCR em tempo real e não foi detectado em nenhum isolado. As cepas com resistência às polimixinas foram testadas por essa metodologia e nenhum dos 12 isolados de *K. pneumoniae* apresentaram positividade para as 5 variantes do gene *mcr*. Para as 5 amostras que foram enviadas para o sequenciamento completo também não houve isolados positivos para esses genes.

4.4 TIPAGEM UTILIZANDO PFGE

Para tipagem dos isolados foi utilizada a técnica de PFGE que utiliza enzimas de restrição de corte raro, específicas para cada espécie, sendo possível diferenciar os perfis mais prevalentes, os isolados que fazem parte de um mesmo grupo de similaridade e os perfis clonais. Essa técnica considerada é recomendada principalmente para surtos em estabelecimentos de saúde, como os hospitais e também surtos comunitários que ocorrem em um curto período de tempo (até três meses) (TENOVER, ARBEIT, *et al.*, 1995). O intervalo de tempo de coleta do presente estudo foi de 13 meses dessa forma, já esperávamos uma maior variabilidade genética entre algumas espécies. Entretanto, foi possível identificar isolados de diferentes regiões do estado que faziam parte do

mesmo grupo de similaridade e isolados clonais que pertencem a regiões e hospitais diferentes mostrando assim, a circulação dessas espécies entre as regiões do estado de Santa Catarina.

A classificação dos isolados em genótipos (pulsotipos gerados pela PFGE) foi representada por letras e números sequenciais, e os genótipos com alguma similaridade genética formaram os grupos de similaridade representados por letras. Quando os isolados eram indistinguíveis (clones) foram caracterizados com o mesmo genótipo formado por uma letra e um número (p. ex., dois isolados indistinguíveis receberam a mesma classificação, ambos genótipo A1), e quando os isolados foram intimamente ou possivelmente relacionados, pertencentes ao mesmo grupo de similaridade, o genótipo foi formado por uma letra e um número sequencial (p. ex., os isolados caracterizados como A1, A2 e A3 pertencem ao mesmo grupo de similaridade A e são intimamente e/ou possivelmente relacionados).

4.4.1 Tipagem dos isolados de *K. pneumoniae*

Entre os 31 isolados de *K. pneumoniae* foram observados 27 genótipos formando 6 grupos de similaridade (A, D, E, F, G e J). Também foram encontrados 3 perfis clonais entre essa espécie (A1, A3 e G1) (Figura 5).

O grupo de similaridade A possui 5 isolados e 2 dois perfis clonais (A1 e A3). Possui isolados da região 5 dos hospitais A e B, e da região 4 do hospital A. Os perfis clonais A1 e A3 são formados por dois isolados cada, que pertencem a região 5 do hospital A e do hospital B, respectivamente. Todos os isolados foram classificados como MDR, possível XDR.

O grupo F é o maior grupo composto por 10 isolados e formado em sua maioria por isolados pertencentes a região 1 do hospital A (n = 7), os outros 3 isolados são das regiões 2, 3 e 4. A maioria dos isolados são MDR, possível XDR (n = 8) e 2 isolados são XDR, possível PDR.

O grupo G é formado por 4 isolados, sendo 3 indistinguíveis (genótipo G1). O grupo é formado por isolados da região 3, 4 e 5.

Cada um dos grupos D, E e J são formados por isolados intimamente e/ou possivelmente relacionados e todos apresentam isolados de diferentes regiões e hospitais.

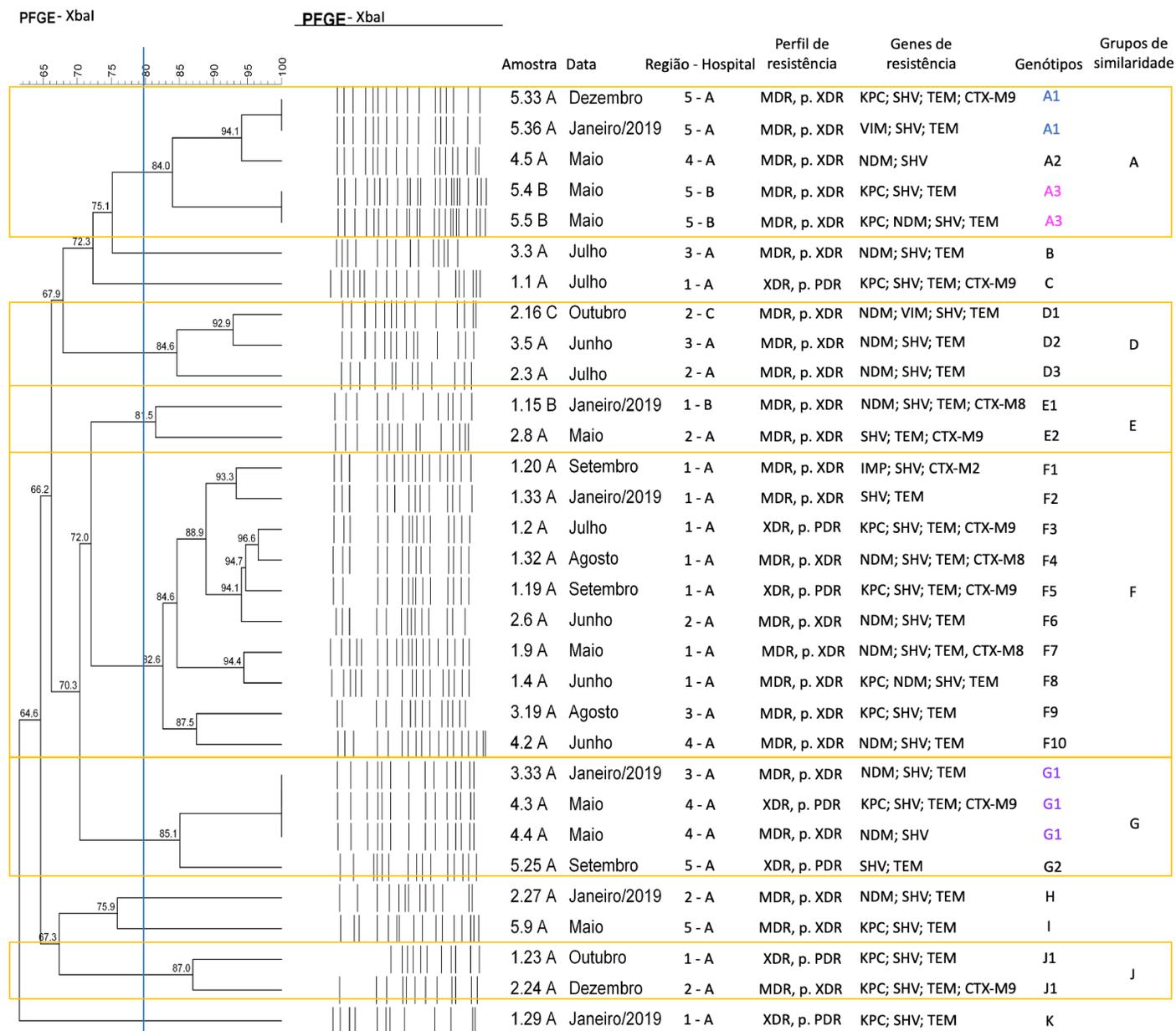
Não foi possível estabelecer uma relação entre os genes de resistência e os grupos de similaridade formados. Porém, alguns genes são interessantes destacar, como as duas amostras com *bla_{VIM}* que pertencem à grupos de similaridade diferentes, sendo o isolado 5.36A do grupo A e isolado 2.16C do grupo D. Outros que chamam a atenção são os isolados 1.4A e 5.5B que

apresentam os mesmos genes de resistência (*bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}* e *bla_{CTX-M1}*) e também foram classificados em grupos de similaridades diferentes, grupo A e F, respectivamente.

Pode-se perceber que os grupos de similaridade formados na espécie de *K. pneumoniae* são bastante heterogêneos e todos possuem isolados de diferentes regiões do estado, inclusive entre amostras clonais, mostrando uma circulação de isolados geneticamente similares no estado de Santa Catarina. Essa heterogeneidade era esperada pois, os isolados são de um longo período (13 meses) e não tivemos conhecimento se houve algum surto no estado para poder relacionar, mesmo assim, conseguimos ver uma disseminação de alguns perfis.

Se avaliarmos a data de cada isolado é possível perceber que um mesmo grupo de similaridade é formado por isolados de meses distintos. Isso ocorreu também com o perfil clonal G1, em que dois isolados (4.3A e 4.4A) são do mês de maio de 2018 e o isolado 3.33A é de janeiro de 2019. Essa informação indica que as cepas, além de estarem espalhadas entre as regiões estado, também estão permanecendo por vários meses dentro dos hospitais.

Figura 5. Dendrograma dos isolados de *K. pneumoniae* formado pelos genótipos e grupos de similaridade, associados ao perfil e genes de resistência.



Os destaques em retângulos amarelos são para os grupos de similaridade geneticamente relacionados entre si. Os isolados indistinguíveis (clones) estão coloridos. A linha azul indica o coeficiente de correlação cofenética de 0,80.

Fonte: elaborado pela autora.

Um estudo que também avaliou amostras em um longo período (2009 a 2013) em 11 estados do Brasil, encontrou 26 genótipos diferentes entre os 102 isolados de *K. pneumoniae* produtoras da enzima KPC (AIRES, PEREIRA, *et al.*, 2020). Outro estudo analisou 23 isolados de *K. pneumoniae* resistentes às polimixinas de dois hospitais do Rio de Janeiro no ano de 2016 e encontrou 10 genótipos diferentes e nenhum isolado dos dois hospitais foi encontrado em um mesmo grupo de similaridade (LONGO, DE SOUSA, *et al.*, 2019).

Em 30 isolados de *K. pneumoniae* isolados de 11 centros da saúde em diferentes estados da Venezuela (2008 a 2012) foi observado uma grande variabilidade genética. Entretanto, assim como nosso estudo, alguns isolados com mesmo genótipo apareceram em diferentes estados do país, mostrando uma disseminação de alguns perfis clonais ou intimamente relacionados (CUAICAL-RAMOS, MONTIEL, *et al.*, 2019).

Pesquisas têm demonstrado uma alta plasticidade genômica nessa espécie, capaz de abrigar muitos elementos genéticos móveis e determinantes de resistência diversos. Não é incomum para *K. pneumoniae* abrigar 4 a 6 diferentes plasmídeos (DIAGO-NAVARRO, CHEN, *et al.*, 2014, HOLT, WERTHEIM, *et al.*, 2015, WYRES, LAM, *et al.*, 2020). Esse fato pode explicar a alta variabilidade encontrada no PFGE.

4.4.2 Tipagem dos isolados de *Enterobacter* spp.

Entre os 5 isolados de *Enterobacter* spp. foram encontrados 3 genótipos e houve a formação de um grupo de similaridade composto por 3 amostras clonais. Os perfis clonais fazem parte da região 3 dos hospitais A e C, e são classificados como XDR apresentando os mesmos genes de resistência (*bla*_{KPC} e *bla*_{TEM}) (Figura 6).

Figura 6. Dendrograma dos isolados de *Enterobacter* spp. formado pelos genótipos e grupo de similaridade, associados ao perfil e genes de resistência.



O destaque em retângulo amarelo é para o grupo de similaridade geneticamente relacionado. Os isolados indistinguíveis (clones) estão coloridos. A linha azul indica o coeficiente de correlação cofenética de 0,80.

Fonte: elaborado pela autora.

4.4.3 Tipagem dos isolados de *A. baumannii*

Os 66 isolados de *A. baumannii* foram classificados em 38 genótipos que formaram 8 grupos de similaridade, observou-se 12 perfis clonais entre os isolados. Se compararmos com os isolados de *K. pneumoniae*, em *A. baumannii* a heterogeneidade foi menor e os grupos de similaridade abrigaram um número grande de isolados, sendo os grupos A, C e I, com maior número (Figura 7).

O grupo A de similaridade é composto por 22 isolados com 12 genótipos e apresentou 6 perfis clonais [A1 (n = 2), A3 (n = 4), A4 (n = 4), A6 (n = 2), A11 (n = 2) e A12 (n = 2)]. Esse grupo abrange 5 dos 6 isolados que apresentaram o gene *bla_{OXA-24}*: o isolado 5.38A pertence ao perfil clonal A1 e também possui o gene *bla_{OXA-23}*; os outros 3 isolados (3.22A, 3.27A, 3.31A) fazem parte do perfil clonal A4, todos pertencentes a região 3 do hospital A; e o quinto isolado (3.26A) faz parte do grupo A5. Apesar dos 5 isolados fazerem parte de 3 genótipos distintos (A1, A4 e A5), todos são intimamente relacionados. O grupo de similaridade B apresenta o sexto isolado com *bla_{OXA-24}* (3.1A), esse grupo possui 4 isolados que são intimamente relacionados.

O grupo C abrange 20 isolados com 7 genótipos distintos e é composto por 4 perfis clonais [C1 (n = 3), C2 (n = 2), C3 (n = 4) e C4 (n = 8)]. O perfil clonal C3 e C4 possuem isolados de diferentes regiões, indicando uma circulação de clones no estado. A maioria dos isolados são intimamente relacionados com exceção do isolado 5.8A que foi considerado possivelmente relacionado aos demais. Todos os 20 isolados apresentam os mesmos genes de resistência, *bla_{OXA-51}*, *bla_{OXA-23}* e *bla_{TEM}*.

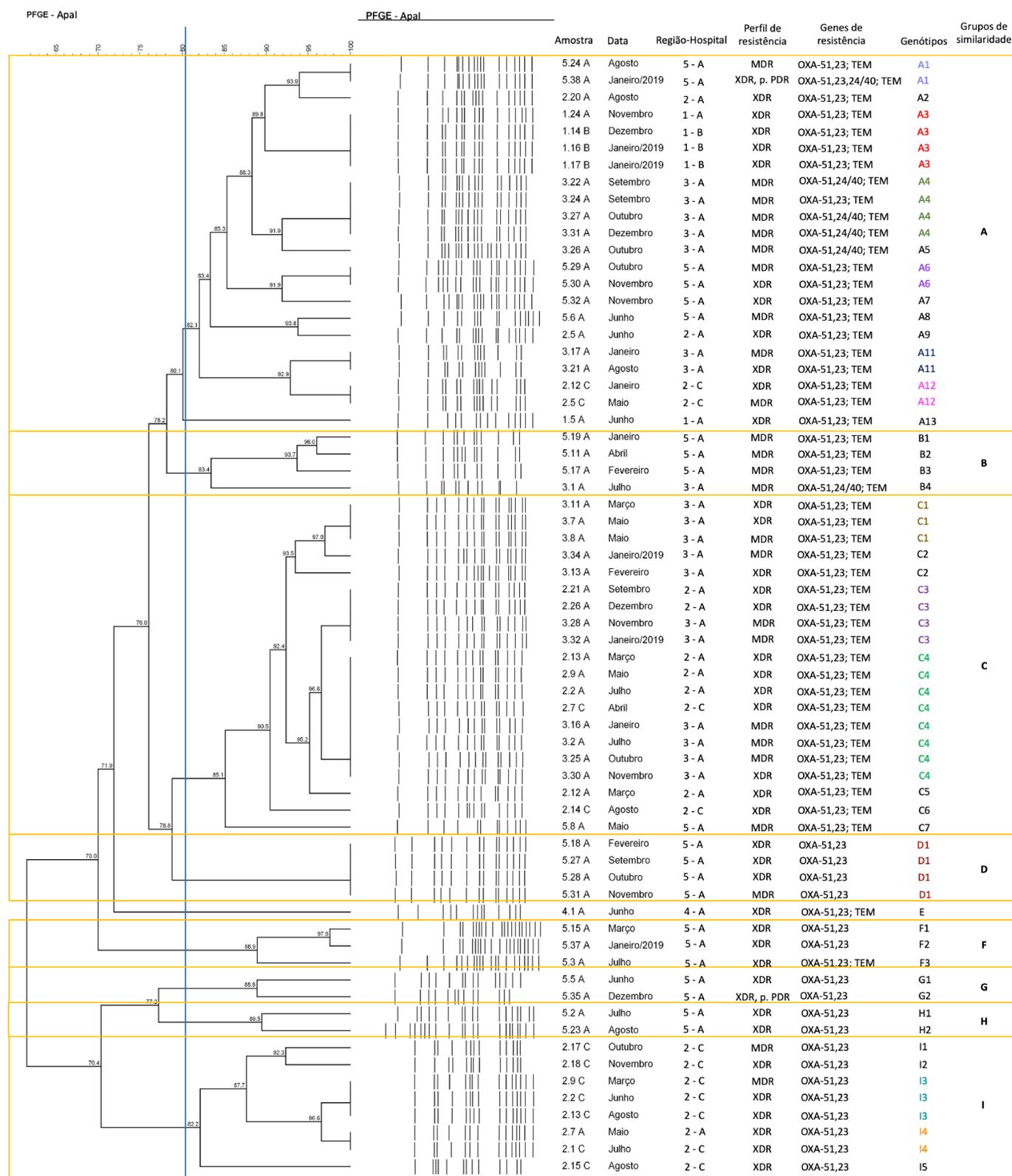
O grupo I com 8 isolados possui 4 genótipos distintos e dois perfis clonais (I3 e I4), todos são da região 2 e do hospital C com exceção de um isolado do hospital A.

Os grupos de similaridade D, F, G e H são compostos por isolados da região 5 do hospital A, sendo que o grupo D é constituído por 4 isolados clonais.

Apesar dos isolados serem de um período longo (13 meses) houve uma maior similaridade genética entres os 66 isolados de *A. baumannii*. Os grupos de similaridades foram compostos por um maior número de isolados nos quais 3 grandes grupos (A, C e I) compreenderam 50 isolados.

A circulação de cepas clonais e intimamente relacionadas entre as regiões do estado e hospitais é observada. Além da circulação inter-hospitalar, ao se avaliar as datas dos isolados, também é constatada uma permanência de cepas clonais e relacionadas por vários meses dentro dos hospitais. Como por exemplo, o perfil clonal C4 que possui amostras da região 3 do hospital A em que foi detectada sua presença por 9 meses (março a novembro). Outro exemplo, trata-se do perfil clonal D1 que permaneceu na região 5 no hospital A por 10 meses (fevereiro a novembro) (Figura 7).

Figura 7. Dendrograma dos isolados de *A. baumannii* formado pelos genótipos e grupos de similaridade, associados ao perfil e genes de resistência.



Os destaques em retângulos amarelos são para os grupos de similaridade geneticamente relacionados entre si. Os isolados indistinguíveis (clones) estão coloridos. A linha azul indica o coeficiente de correlação cofenética de 0,80.

Fonte: elaborado pela autora.

Um estudo que avaliou 172 isolados de *A. baumannii* de 10 centros médicos em um período de 6 meses, encontrou 88 genótipos que foram agrupados em 14 grupos de similaridade com 29 perfis clonais. Apresentaram grupos com um número alto de isolados (21 a 27) assim como o presente estudo. Também observaram uma grande circulação dos isolados entre os 10 centros médicos estudados (BORAL, UNALDI, *et al.*, 2019).

Entre outubro de 2002 e maio de 2005, um estudo realizado no Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR) avaliou a evolução temporal de 172 isolados de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos produtores da enzima OXA-23. Foram identificados 13 genótipos diferentes e 4 grupos de similaridade, sendo 3 desses grupos compreendendo 98,8% dos isolados. Um dado interessante foi o encontro de isolados de *A. baumannii* no ano de 2002 com um padrão similar dos isolados que tinham sido encontrados em 1999, quando foi detectado o primeiro isolado da instituição com *bla*_{OXA-23} (SCHIMITH BIER, LUIZ, *et al.*, 2010). Assim como em nosso estudo, observaram uma circulação de isolados clonais e intimamente relacionados durante todo o período do estudo sugerindo que essas cepas estavam circulando nas instituições por meses e até anos.

Chagas e colaboradores investigaram a relação genética de 155 *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos de 11 estados brasileiros em um período de 3 anos (2008 a 2011). O PFGE revelou 28 genótipos diferentes, sendo que o genótipo clonal mais prevalente, com 58 isolados, foi encontrado em 8 estados (CHAGAS, CARVALHO, *et al.*, 2014).

Os dados observados no presente estudo juntamente com os da literatura, confirmam que em amostras de *A. baumannii* há uma grande circulação de cepas clonais em uma mesma instituição, bem como instituições diferentes de um mesmo estado ou não. Há também uma permanência dessas cepas nas instituições por um longo período (meses ou anos).

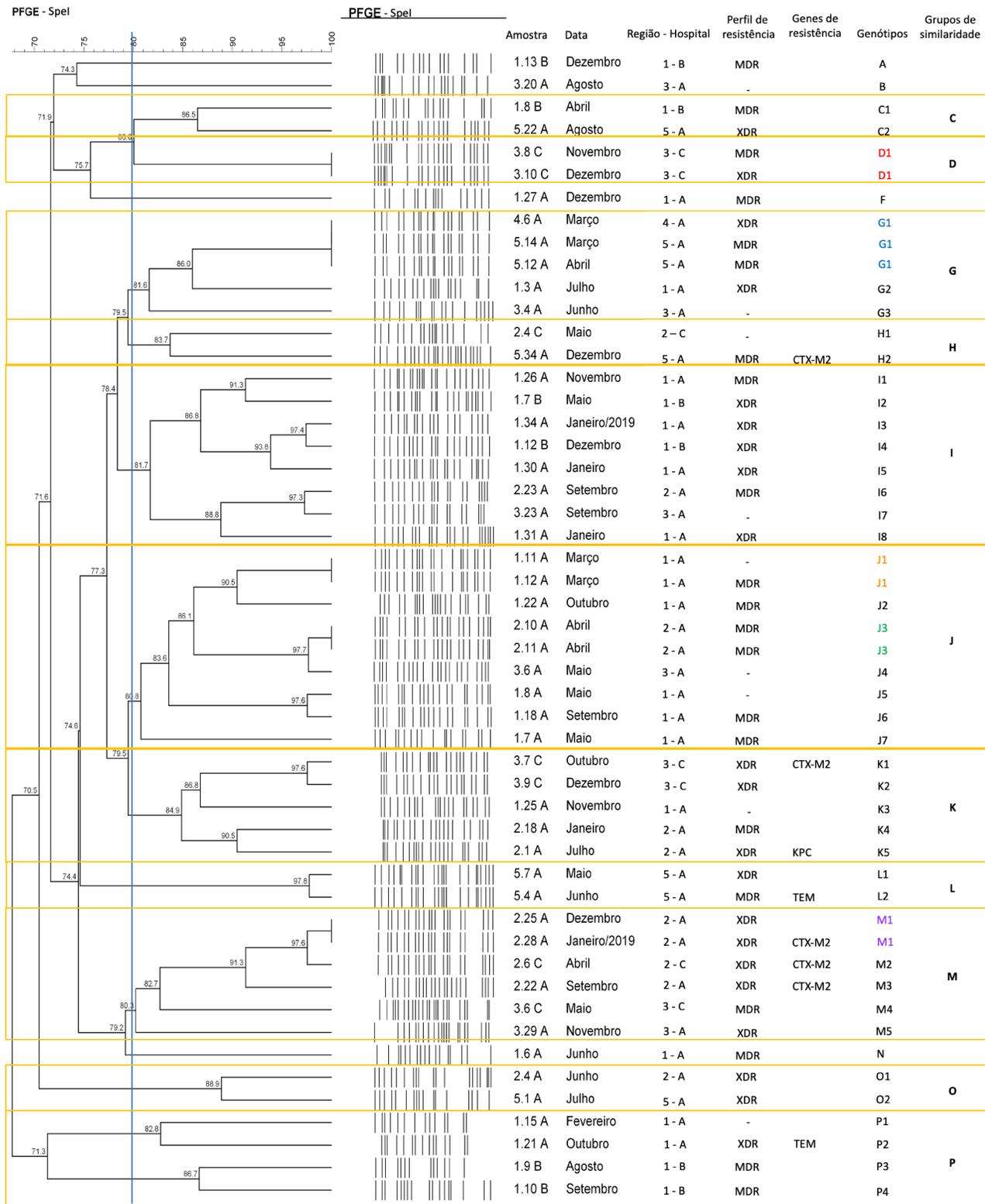
4.4.4 Tipagem dos isolados de *P. aeruginosa*

Os 51 isolados de *P. aeruginosa* apresentaram 45 genótipos distintos que formaram 11 grupos de similaridade. Foram observados 5 perfis clonais com poucos isolados em cada, 4 deles (D1, J1, J3 e M1) com 2 isolados e um perfil (G1) com 3. O perfil clonal G1 apresenta isolados das regiões 4 e 5, mostrando uma circulação desse genótipo clonal. Houve uma maior heterogeneidade em *P. aeruginosa* assim como na espécie de *K. pneumoniae* (Figura 8).

Apesar da maior heterogeneidade é possível observar uma grande circulação de cepas intimamente e possivelmente relacionadas entre as regiões do estado, em que todos os 11 grupos de similaridades possuem isolados de diferentes regiões e hospitais. Os 3 maiores grupos de similaridade [I (n = 8), J (n = 7) e K (n = 5)] possuem isolados intimamente relacionados que permaneceram nos hospitais por 13, 7 e 12 meses, respectivamente.

O isolado 2.1A que possui o gene *bla_{KPC}* pertence ao grupo de similaridade K e não possui nenhum isolado clonal, somente intimamente relacionados (Figura 8).

Figura 8. Dendrograma dos isolados de *P. aeruginosa* formado pelos genótipos e grupos de similaridade, associados ao perfil e genes de resistência.



Os destaques em retângulos amarelos são para os grupos de similaridade geneticamente relacionados entre si. Os isolados indistinguíveis (clones) estão coloridos. A linha azul indica o coeficiente de correlação cofenética de 0,80.

Fonte: elaborado pela autora.

Para determinar os padrões de circulação com o passar dos anos na cidade do Rio de Janeiro, um estudo avaliou 88 isolados de *P. aeruginosa* selecionados entre 21 anos (1995 a 2015). Foi encontrado 33 genótipos diferentes com 18 perfis clonais com poucas amostras em cada. Não foi encontrado um mesmo clone durante os 21 anos, mas alguns apareceram durante 10 anos (DE OLIVEIRA SANTOS, PEREIRA DE ANDRADE, *et al.*, 2019).

Um estudo feito na cidade de São Paulo que avaliou a similaridade de 25 isolados que apresentavam o mesmo perfil fenotípico e genotípico não encontrou nenhum padrão de similaridade predominante. Dos 25 isolados foi observado 17 genótipos diferentes com 3 perfis clonais com apenas 2 isolados em cada. Esses dados demonstram que mesmo em isolados que pareciam ser clones, pelas suas características fenotípicas e genotípicas, isso não ocorre ao se avaliar o perfil de DNA através do PFGE (CAMPANA, XAVIER, *et al.*, 2017).

A espécie *P. aeruginosa* possui um genoma central altamente conservado e de baixa diversidade de sequência e também um genoma acessório altamente variável que explica a diversidade no genoma de espécies de *P. aeruginosa* intra e interclonal, a composição individual dessa parte variável é adquirida por transferência horizontal de genes de diferentes fontes, incluindo outras espécies e gêneros (KLOCKGETHER, CRAMER, *et al.*, 2011).

De um modo geral, entre as espécies com maior heterogeneidade (*K.pneumoniae* e *P. aeruginosa*) e *A. baumannii* com uma maior similaridade entre as amostras, é possível observar uma grande circulação de cepas entre as 5 regiões do estado e por longo período. Essas cepas muitas vezes eram clones ou intimamente relacionadas. O uso do PFGE em estudos que avaliam vários centros é importante para estimar a relação clonal entre os isolados, em que a detecção de um mesmo genótipo ou similar em diferentes instituições do estado sugere que medidas de controle de infecção devem ser fortalecidas e revisadas.

4.5 SEQUENCIAMENTO DO GENOMA COMPLETO

Para o sequenciamento dos isolados foi utilizada a plataforma Illumina de sequenciamento de nova geração. As vantagens dessa plataforma são o alto rendimento, a alta precisão, o custo mais baixo por base sequenciada, as várias formas de preparo de biblioteca e a diversidade de aplicações, como gerenciamento de surtos, identificação de bactérias usando a região do 16S-23S rRNA, abordagens metagenômicas, entre outras. As limitações desse método são as leituras curtas (do inglês *short-reads*) que dificultam a resolução de regiões repetitivas do genoma, tornando

difícil a identificação e montagem dessas regiões. Isso pode ocorrer principalmente com a montagem de plasmídeos que apresentam várias cópias no genoma bacteriano, induzindo montagens fragmentadas e fazendo com que a montagem de sequências completas sejam um desafio (DEURENBERG, BATHOORN, *et al.*, 2017, KUMAR, COWLEY, *et al.*, 2019, ORLEK, STOESSER, *et al.*, 2017). Essa limitação da técnica para montagens dos plasmídeos pode ser percebida nos isolados do presente estudo, em que muitas vezes não foi possível realizar a montagem do plasmídeo inteiro ou afirmar que um grupo de incompatibilidade teve relação com um gene de resistência.

Para o sequenciamento completo foram escolhidos isolados que apresentaram vários genes de resistência ou que fossem mais raros de aparecer naquela espécie (Quadro 10).

Quadro 10. Isolados selecionados para o sequenciamento do genoma completo.

Isolados	Espécie	Genes detectados por PCR
2.1A	<i>P. aeruginosa</i>	<i>bla_{KPC}</i>
2.16C	<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla_{NDM}</i> , <i>bla_{VIM}</i> , <i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{TEM}</i> , <i>bla_{CTX-M1}</i>
5.36A	<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla_{VIM}</i> , <i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{TEM}</i> , <i>bla_{CTX-M1}</i>
1.4A	<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla_{KPC}</i> , <i>bla_{NDM}</i> , <i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{TEM}</i> , <i>bla_{CTX-M1}</i>
5.5B	<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla_{KPC}</i> , <i>bla_{NDM}</i> , <i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{TEM}</i> , <i>bla_{CTX-M1}</i>

Fonte: elaborado pela autora.

Os parâmetros de qualidade do sequenciamento foram avaliados segundo a qualidade das leituras (*reads*) após a trimagem, no qual para todos os 5 isolados mais de 75% das sequências apresentaram qualidade superior a 30. Outros parâmetros considerados após a montagem dos *scaffolds* foram as métricas N50, L50, N90 e L90, o tamanho da sequência, número e tamanho dos *contigs* e quantidade de *gaps*³ (Quadro 11).

³ A sobreposição de leituras (*reads*) do sequenciamento do tipo paired-end formam os *contigs* (sequência de bases conhecidas com um alto nível de confiança); os *contigs* e *gaps* de tamanhos conhecidos formam o *scaffold* (montagem da sequência de DNA). Ou seja, a sequência de DNA montada (*scaffold*) consiste na sobreposição de *contigs* e *gaps* de tamanhos conhecidos.

Quadro 11. Parâmetros de qualidade da montagem dos genomas dos isolados.

	Isolados				
	2.1A	2.16C	5.36A	1.4A	5.5B
Espécie	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>
Região/hospital	2/A	2/C	5/A	1/A	5/B
Sítio de isolamento	Líquido ascítico	Lavado brônquico	Urina	Escarro	Líquor
Tamanho do genoma (pb)	6.544.987	7.292.986	6.296.098	5.708.289	5.845.203
%CG	66,8%	55%	56%	57%	57%
Nº de contigs	995	13.394	6.342	340	1278
Maior contig	264.515	58.798	133.387	560.264	153301
N50 (pb)	90.328	11.695	23.347	198.097	12.000
L50	23	154	71	9	113
N90 (pb)	25.283	146	150	41.461	1.753
L90	76	5.804	944	29	612
gaps	12	15	7	10	7

Fonte: elaborado pela autora.

Como se pode perceber pelo quadro 11, os parâmetros variaram bastante entre as amostras e acabaram refletindo nos resultados, o desejável para um bom sequenciamento são poucos *contigs*, porém longos. Entretanto, o que mais reflete na qualidade da montagem de plasmídeos é a cobertura do sequenciamento, em que uma cobertura de 100x seria o ideal. A cobertura do sequenciamento que foi possível realizar foi de 500 mil *reads*, na qual para um genoma de uma bactéria com tamanho de 5 Mb, é equivalente a uma cobertura de 10x. Os isolados tinham aproximadamente um genoma de 5 Mb, com isso um sequenciamento de 1 milhão de *reads* proporcionaria uma cobertura de 100x. Porém, o custo de um sequenciamento com alta cobertura é bastante alto e não foi possível optar por essa escolha.

O isolado 2.1A de *P. aeruginosa* chamou atenção pois o gene de resistência *bla*_{KPC} nessa espécie é raro, com poucos relatos na literatura. Embora incomum, *P. aeruginosa* produtora da enzima KPC tem sido aos poucos relatada no mundo, inclusive no Brasil.

No banco de dados de detecção de patógenos do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) estão depositadas 38 sequências relacionadas com *P. aeruginosa* produtora da KPC, sendo 14 dos EUA, 6 da Colômbia, 2 do Brasil, 2 da Espanha, 1 do Canadá, China e França e 5 que não foram especificados a sua origem.

O primeiro isolado com o gene *bla*_{KPC} codificado cromossomicamente foi encontrado na Colômbia em 2007 (VILLEGAS, LOLANS, CORREA, KATTAN, LOPEZ, QUINN, *et al.*, 2007) e no Brasil no ano de 2008 (DE PAULA-PETROLI, CAMPANA, *et al.*, 2018), e o primeiro isolado do Brasil com *bla*_{KPC} mediado por plasmídeos foi isolado em 2011 (CARRARA-MARRONI, CAYÔ, *et al.*, 2015). Apenas seis sequências de plasmídeos em *P. aeruginosa* com *bla*_{KPC} foram encontrados em bases públicas de dados: dois plasmídeos que pertencem ao grupo de incompatibilidade IncP-6 provenientes da Colômbia e da China (KC609323.1, 2006 e KU578314.1, 2010), dois IncU da Colômbia e do Brasil (KC609322.1, 2006 e KX169264.1, 2013), um IncQ do Brasil (NOKO0000000.1, 2014) e outro isolado do Brasil que não foi classificado em nenhum grupo de incompatibilidade (CM003767.1, 2011) (DE OLIVEIRA SANTOS, ALBANO, *et al.*, 2018, SHI, LIANG, *et al.*, 2018).

O isolado 2.1A de *P. aeruginosa* com *bla*_{KPC} encontrado foi isolado do líquido ascítico de um paciente do sexo feminino de 49 anos, proveniente da região 2 e do hospital A. O isolado foi classificado como XDR sendo resistente à piperacilina/tazobactam, ceftazidima, imipenem, meropenem, aztreonam e gentamicina, apresentando sensibilidade à cefepime, ciprofloxacina, norfloxacina, levofloxacina, ampicilina, tobramicina e polimixinas B e E.

O genoma da bactéria apresentou 5.999 sequências de proteínas codificadas (CDS), 70 tRNA, 7 rRNA, 1 tmRNA e 2 arranjos de CRISPR. A análise *in silico* de MLST mostrou que o isolado pertence ao ST312, um tipo de sequência em que o *bla*_{KPC} ainda não tinha sido encontrado. A análise do resistoma identificou vários genes que codificam resistência a β -lactâmicos (*bla*_{OXA-50}, *bla*_{PAO} e *bla*_{KPC-2}), aminoglicosídeos [*aph(3')-IIb*], fosfomicina (*fosA*), fencicol (*catB7*) e quinolonas (*crpP*).

Devido ao sequenciamento de sequências curtas, não foi possível montar o plasmídeo completo, mas através da análise *in silico* com o PlasmidFinder 2.1 foi possível identificar um pequeno plasmídeo do grupo de incompatibilidade IncU (7.975 pb) que abrigava o gene *bla*_{KPC}. Esse plasmídeo compartilha 86,3% de identidade com outro plasmídeo IncU da Colômbia (KC609322.1), com 7.995 pb e ST1006 (CUZON, NAAS, *et al.*, 2011) (Figura 10). Apesar desse

plasmídeo ter uma replicase, os genes de mobilização, partição e conjugação estão faltando em ambos (IncU da Colômbia e do presente estudo), mostrando que esses plasmídeos não são conjugativos, não podendo ser transferidos por conjugação (NAAS, BONNIN, *et al.*, 2013).

O plasmídeo contém 12 *open reading frames*, sendo três proteínas hipotéticas de função desconhecida (Figura 10). Entretanto, a proteína hipotética 1 (ORF1) mostrou 30% de identidade aminoacídica com a proteína anti-CRISPR AFC22483.1, que é capaz de inibir a família I-F da CRISPR em *P. aeruginosa*. Essa análise foi feita utilizando o banco de dados de proteínas anti-CRISPRdb (<http://cefg.uestc.cn/anti-CRISPRdb/>).

As bactérias possuem um sistema de defesa que é capaz de restringir a infecção por transferência horizontal de genes e por bacteriófagos como forma de proteção do seu genoma. Um dos sistemas é conhecido como CRISPR-Cas que confere uma imunidade hereditária contra vírus, plasmídeos e outros elementos genéticos móveis. Esse sistema é capaz de sequestrar pequenos fragmentos de DNA dos invasores para fornecer uma espécie de memória molecular de infecção para a bactéria. Porém, quando a bactéria se encontra sob pressão seletiva, como na presença de antimicrobianos, o sistema pode ser perdido para poder adquirir um gene de resistência (SHEHREEN, CHYOU, *et al.*, 2019). Uma forma de bloquear esse sistema é através de proteínas anti-CRISPR (proteínas Acr) que têm sido identificadas em elementos genéticos móveis, vírus e bactérias e foram identificadas pela primeira vez em *Pseudomonas aeruginosa*. Foram identificadas 24 diferentes famílias de proteínas anti-CRISPR com habilidade para bloquear diferentes sistemas CRISPR-Cas (BONDY-DENOMY, Joe, PAWLUK, *et al.*, 2013, BONDY-DENOMY, Joseph, 2018).

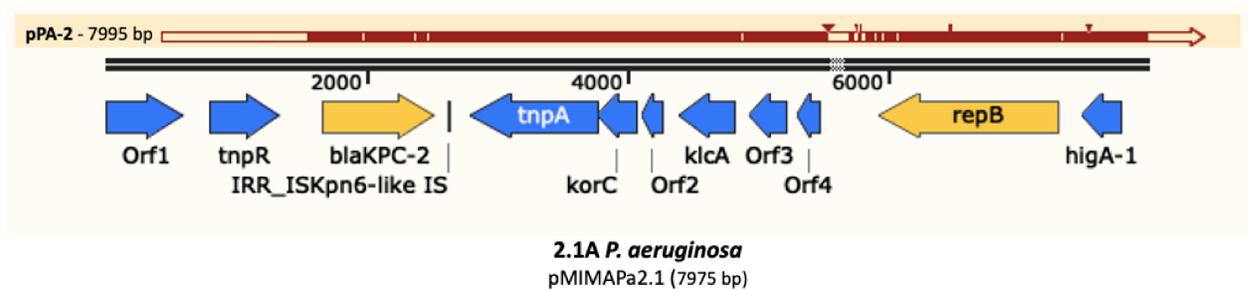
Um estudo encontrou uma associação positiva entre anti-CRISPR e genes de resistência a antimicrobianos em *P. aeruginosa* nas classes de aminoglicosídeos, β -lactâmicos, fosfomicina e fenicol. Foi encontrado o sistema anti-CRISPR, genes de resistência e CRISPR-Cas ocorrendo concomitantemente em mais de 460 cepas da espécie, indicando que a inibição dos sistemas CRISPR-Cas por anti-CRISPR pode facilitar a aquisição de genes de resistência em *P. aeruginosa* (SHEHREEN, CHYOU, *et al.*, 2019).

O gene *bla*_{KPC} do plasmídeo encontrado não foi associado com o transposon Tn4401, que é considerado o transposon mais associado com o gene *bla*_{KPC} em enterobactérias. O gene *bla*_{KPC} é flanqueado por uma transposase, uma sequência de inserção IRR ISKpn6-like e uma recombinase, mostrando a capacidade do gene *bla*_{KPC} em se adaptar a diferentes elementos móveis (Figura 9).

A associação do gene *bla_{KPC}* em um plasmídeo IncU em uma *P. aeruginosa* ST312 nunca foi descrita e esse é o primeiro reporte genômico da literatura de *P. aeruginosa* com *bla_{KPC}* do Sul do Brasil. Apesar de não ser encontrado na literatura, temos o relato de profissionais que trabalham em laboratórios de bacteriologia onde o gene *bla_{KPC}* em bactérias dessa espécie vem sendo encontrado na clínica [Pillonetto e Scheffer (comunicação pessoal, 2020)].

As sequências do genoma completo e do plasmídeo foram nomeadas como MIMA-Pa2.1 e pMIMAPa2.1 e foram depositadas no GenBank com os números de acesso JACGTM000000000 e MT683857, respectivamente.

Figura 9. Alinhamento dos plasmídeos do grupo IncU que carregam o gene *bla_{KPC}*.



O alinhamento das sequências dos plasmídeos do grupo IncU [pPA-2 da Colômbia (7.995 pb) e pMIMAPa2.1 do presente estudo (7.975 pb)] possuem 86,3% de identidade. Em amarelo estão o gene *bla_{KPC}* e o replicon do plasmídeo IncU (rep B). Os pequenos traços em branco na vertical, que podem ser visualizados na sequência do plasmídeo pPA-2 (em vermelho) e pMIMAPa2.1 (em preto), representam as diferenças entre as duas sequências com 111 *mismatches*⁴ e 10 *gaps*⁵.

Fonte: elaborada pela autora utilizando o programa SnapGene®.

O isolado de *K. pneumoniae* 1.4A foi isolado do escarro de um paciente masculino de 58 anos no hospital A da região 1. Nas análises do PFGE foi classificado no maior grupo de similaridade, o grupo F. No TSA realizado apresentou resistência a todos os antimicrobianos da classe das ampicinilas, cefalosporinas, carbapenêmicos, fluoroquinolonas e monobatâmicos, sendo sensível somente à amicacina e às polimixinas. Foi classificado como MDR, possível XDR.

⁴ *Mismatches*: regiões de discordância no alinhamento entre sequências, são mutações pontuais em que os nucleotídeos não são idênticos.

⁵ *Gaps*: inserções ou deleções entre as sequências.

O genoma da bactéria apresentou 5.493 sequências de proteínas codificadas (CDS). O MLST *in silico* classificou o isolado como ST437 que faz parte do complexo clonal CC258. Os ST11, ST340 e ST437 são os clones predominantes no Brasil e todos pertencem ao complexo clonal CC258, que é considerado um clone de alto risco bastante disseminado no mundo todo. Esses clones foram detectados causando infecções e colonizando pacientes, e são associados principalmente à espécie de *K. pneumoniae* que possuem o gene *bla_{KPC}* (AIRES, PEREIRA, *et al.*, 2020, MUNOZ-PRICE, POIREL, *et al.*, 2013). Aires e colaboradores detectaram isolados pertencentes ao complexo clonal CC258 em 11 estados brasileiros, tendo uma taxa de 70% entre os 102 isolados pesquisados de *K. pneumoniae* produtora de *bla_{KPC}* (AIRES, PEREIRA, *et al.*, 2020).

Por PCR, foram encontradas duas carbapenemases (*bla_{KPC}* e *bla_{NDM}*), *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* e *bla_{CTX-MI}*. O sequenciamento confirmou os genes encontrados na PCR e detectou outros genes de resistência: às fluoroquinolonas [*oqx_B*, *aac(6')-Ib-cr* e *oqx_A*; (*fosA*)]; à fosfomicina (*fosA*); aos aminoglicosídeos [*aadA1*, *aac(6')-Ib3*, *aadA2b*, *aph(6)-Id*, *aph(3'')-Ib*, *aac(3)-II* e *aac(6')-Ib-cr*]; aos macrolídeos [*mph(A)*]; inibidores de folato (*sul1*, *dfrA15*, *sul2* e *dfrA30*); às tetraciclinas [*tet(A)*, *tet(C)*, *tet(D)*]; aos fenicois (*catB3*, *cmlA1*, *catB3*); e outras β-lactameses (*bla_{OXA-9}* e *bla_{OXA-1}*).

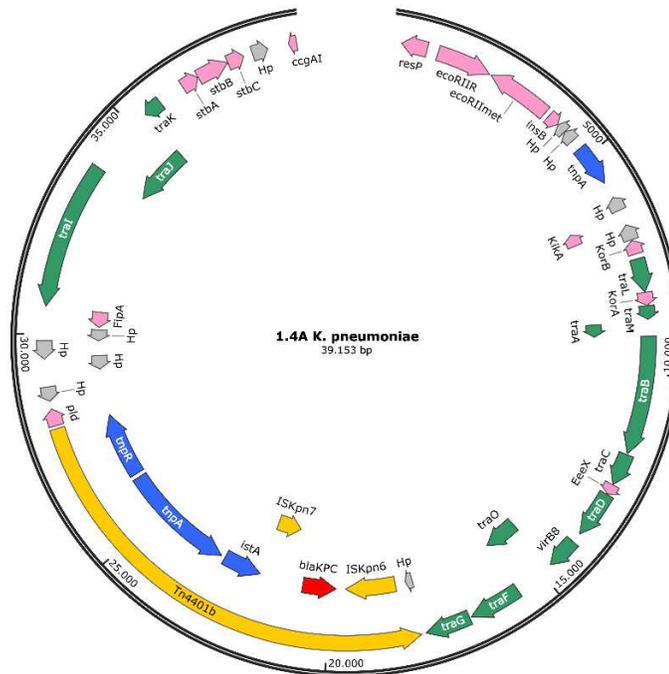
O primeiro isolado de *K. pneumoniae* com coprodução dos genes *bla_{NDM}* e *bla_{KPC}* foi encontrado na Índia em 2010 (KUMARASAMY, KALYANASUNDARAM, 2012). No Brasil, foi encontrado no Rio de Janeiro em 2013, porém os isolados não foram sequenciados para estudo dos possíveis plasmídeos (AIRES, PEREIRA, *et al.*, 2017).

Na análise do PlasmidFinder do isolado 1.4A foram encontrados 6 plasmídeos: Col(pHAD28), IncC, IncFIB(K), IncFIB(pQil), IncFII(K), IncM1 e IncN. Devido o sequenciamento de *short-reads*, não foi possível estabelecer a relação dos plasmídeos com os genes de resistência, pois os *contigs* onde estavam localizados os genes de resistência não apresentaram o *replicon* do plasmídeo. Entretanto, alinhamentos com sequências conhecidas do banco de dados foram realizados para poder avaliar melhor o contexto genético dos genes e supor uma relação com algum plasmídeo.

O gene *bla_{KPC}* foi encontrado em um *contig* com 39.152 pb e estava localizado em um elemento genético móvel, o transposon Tn440Ib, com duas sequências de inserção IS*Kpn6* e

ISKpn7. Também foram encontradas transposases e genes envolvidos no mecanismo de conjugação de plasmídeos, somente o *replicon* do plasmídeo não estava presente (Figura 10).

Figura 10. Contexto genético em que o gene *bla_{KPC}* estava inserido no isolado 1.4A de *K. pneumoniae*.



O gene de resistência *bla_{KPC}* está destacado em vermelho, os elementos genéticos móveis estão em amarelo (*Tn4401b*, *ISKpn6* e *ISKpn7*), em azul estão as transposases e os genes envolvidos no sistema de conjugação de plasmídeo estão em verde. Demais genes estão em rosa e proteínas hipotéticas em cinza.

Fonte: elaborada pela autora utilizando o programa SnapGene®.

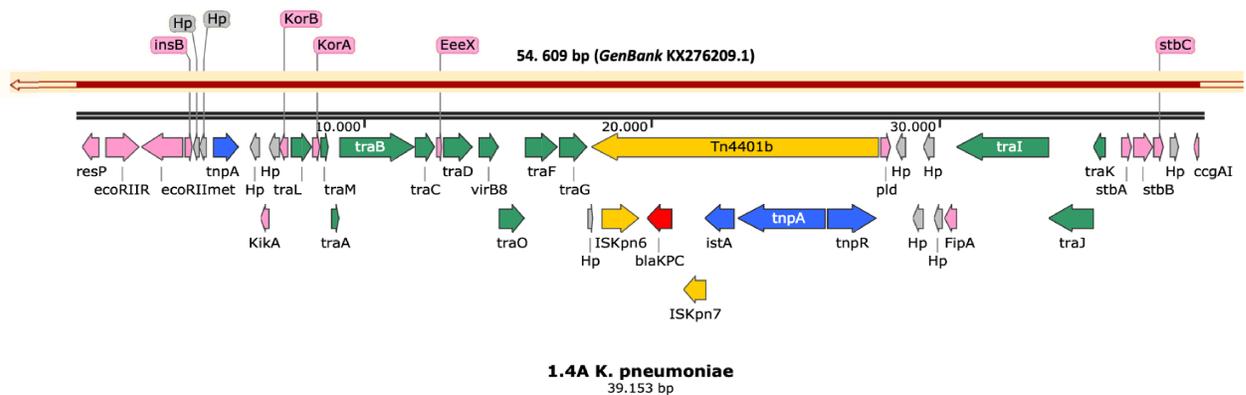
O gene *bla_{KPC}* é principalmente associado com o transposon *Tn4401* que é classificado como transposon do tipo 3 e apresenta um tamanho de aproximadamente 10 Kb. A sua estrutura consiste em genes de transposases, resolvase, o gene *bla_{KPC}* e duas seqüências de inserção *ISKpn6* e *ISKpn7*. Apresentam 9 isoformas (*Tn440a* até *Tn440i*), sendo que a isoforma *Tn440b* a mais comum e mais encontrada no Brasil (AIRES, PEREIRA, *et al.*, 2020, LEE, C, LEE, *et al.*, 2016, PEREIRA, DE ARAUJO, *et al.*, 2013).

Ao realizar o alinhamento da seqüência que abrigava o gene *bla_{KPC}* no banco de dados do NCBI, as 6 seqüências que apresentaram 100% de cobertura e 99,99% a 100% de identidade, eram

de plasmídeos que continham o transposon *Tn4401b* com o gene *bla_{KPC}* e faziam parte do grupo de incompatibilidade plasmidial IncN. Todas as 6 sequências completas do plasmídeo IncN com *bla_{KPC}* possuíam em torno de 54.600 pb. A hipótese é de que o gene *bla_{KPC}* do isolado 1.4A possa fazer parte do plasmídeo IncN, que foi detectado no isolado, mas infelizmente no *contig* onde o gene se encontra não apareceu o *replicon* do plasmídeo, não sendo possível afirmar a relação com o IncN.

Na Figura 11 está a representação do alinhamento com uma das sequências encontradas no GenBank, onde o *contig bla_{KPC}* do isolado 1.4A apresentou 100% de cobertura e identidade.

Figura 11. Alinhamento do contexto genético em que se encontra o *bla_{KPC}* do isolado 1.4A com um plasmídeo IncN.



Alinhamento do plasmídeo IncN (GenBank KX2762209.1) com o *contig* do gene *bla_{KPC}* do isolado 1.4A. A parte da sequência KX2762209.1 que está em vermelho representa a região que possui 100% de identidade com o *contig bla_{KPC}* do isolado 1.4A. A parte não pintada representa a região onde está localizado o *replicon* do plasmídeo IncN que não foi mapeado na sequência do isolado 1.4A.

Fonte: elaborada pela autora com o programa SnapGene®.

O isolado 1.4A também apresentou o gene *bla_{NDM}*, que foi encontrado em um *contig* com 4.702 pb que apresentava somente o gene de resistência de 813 pb, uma transposase da família IS91, o gene *ble_{MBL}* que confere resistência à bleomicina e uma isomerase. Não apresentou a sequência de inserção ISAbal25 que é comum de se encontrar em plasmídeos com o gene *bla_{NDM}*, nem o replicon do plasmídeo que poderia relacionar esse gene à algum grupo de incompatibilidade.

Entre os plasmídeos encontrados, o isolado 1.4A apresentou o plasmídeo IncC, que é o grupo de incompatibilidade que o gene *bla_{NDM}* é mais encontrado em enterobactérias

(CARATTOLI, 2013), porém não está inserido no mesmo *contig* onde se encontra o gene de resistência, dessa forma não foi possível afirmar essa relação. O *bla*_{NDM} já foi descrito em grupos de incompatibilidade IncL/M, IncA/C, IncF, IncHI1e IncN, sendo o IncA/C e IncHI os mais frequentemente associados com este gene (CARATTOLI, 2013).

Outro isolado sequenciado que também apresentou duas carbapenemases foi o 2.16C (metalo- β -lactamase do tipo NDM e VIM), no qual os genes detectados por PCR foram: *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M1}. Essa cepa foi isolada no hospital C da região 2, de lavado brônquico de um paciente do sexo masculino com 59 anos. No TSA apresentou resistência a todos os antimicrobianos testados com exceção de aztreonam, amicacina e polimixinas B e E, foi classificado como MDR, possível XDR. Na tipagem pelo PFGE foi classificado no grupo de similaridade D, não tendo outros clones detectados nas amostras analisadas.

As metalo- β -lactamases mais identificadas no mundo todo em enterobactérias são as do tipo NDM e VIM, sendo a última mais comum na Europa e Ásia. A coprodução dessas duas metalo- β -lactamases foi raramente relatado no mundo todo, sendo encontradas em relatos isolados na Tunísia, Marrocos, Croácia e Grécia (BARGUIGUA, EL OTMANI, *et al.*, 2013, BEDENIĆ, SARDELIĆ, *et al.*, 2016, DZIRI, AYARI, *et al.*, 2019, PAPAGIANNITSIS, MALLI, *et al.*, 2017). No Brasil, até o momento, não existem relatos na literatura de isolados de *K. pneumoniae* com coprodução das metalo- β -lactamases NDM e VIM, sendo, portanto, o isolado 2.16C do presente estudo o primeiro relato genômico do Brasil. Apesar de não ser encontrada na literatura, da mesma forma que em *P. aeruginosa* com o gene *bla*_{KPC}, também temos o relato de profissionais que trabalham em laboratórios de bacteriologia onde essa associação tem sido encontrada na clínica [Pillonetto e Scheffer (comunicação pessoal, 2020)].

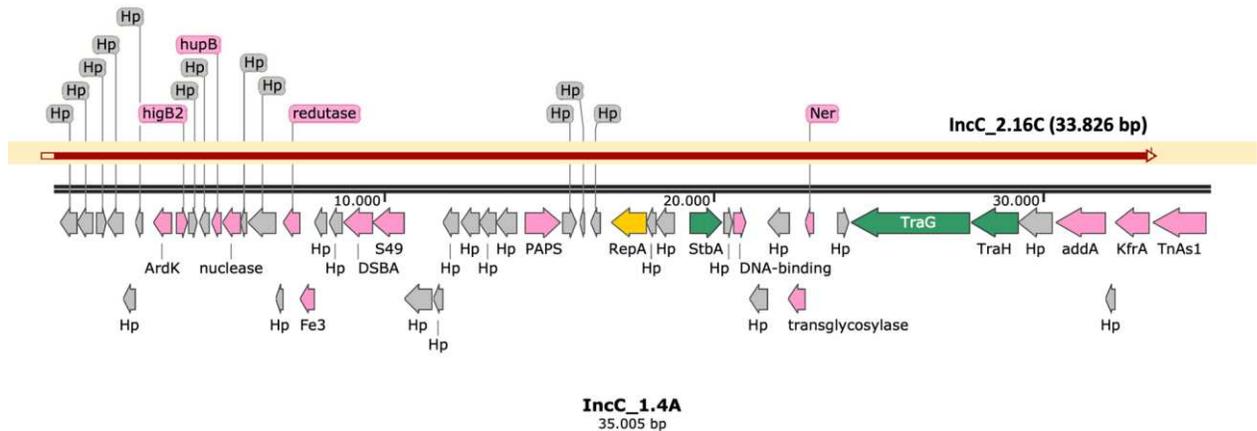
Na análise do MLST *in silico* o isolado 2.16C foi classificado como ST340 fazendo parte do complexo clonal CC258, o mesmo complexo da amostra 1.4A. Como já mencionado, o ST340 também é um dos clones predominantes no Brasil.

Todos os genes detectados por PCR foram confirmados pelo sequenciamento e a análise do resistoma detectou vários outros genes de resistência: aos aminoglicosídeos [*aac(3)-IId*, *aac(6')-Ib3*, *aadA1*, *aadA2*, *aph(3'')-Ib*, *aph(3'')-Ib*, *aph(3'')-Ib*, *aph(3')-XV*, *aph(6)-Id* e *aph(6)-Id*]; aos β -lactâmicos (*bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{SHV-182}, *bla*_{TEM-1C} e *bla*_{VIM-1}); à fosfomicina (*fosA*); aos macrolídeos [*erm(B)* e *mph(A)*]; aos fenicóis (*catB3*); às quinolonas [*aac(6')-Ib-cr*, *oqxA*,

oqxB, *qnrB19* e *qnrB2*]; à rifampicina (*ARR-3*); às sulfonamidas (*sul1* e *sul2*); às tetraciclina [tet(A)], ao trimetoprim (*dfrA12* e *dfrA14*).

O PlasmidFinder encontrou 5 plasmídeos diferentes, IncC, IncFIB(K), IncFII(K), IncN2 e IncR. Novamente não foi possível associar os genes de resistência aos grupos de incompatibilidade plasmidial, pois os *contigs* dos plasmídeos não possuíam o gene de resistência. Assim como na amostra 1.4A, o alinhamento das duas sequências IncC apresentou 98,5% de similaridade (Figura 12). O plasmídeo do grupo IncC pode ser o que abriga o gene *bla_{NDM}* nas duas amostras.

Figura 12. Alinhamento dos plasmídeos IncC dos isolados 1.4A e 2.16C.



A parte da sequência do isolado 2.16C (33.826 pb) que está em vermelho representa a região que possui 98,8% de identidade com o IncC do isolado 1.4A (35.005 pb). O *replicon* do plasmídeo está em amarelo, os genes envolvidos no sistema de conjugação do plasmídeo estão em verde, demais genes estão em rosa e proteínas hipotéticas em cinza. Fonte: elaborada pela autora com o programa SnapGene®.

A outra carbapenemase do tipo metalo- β -lactamases que o isolado 2.16C apresentou foi a do tipo VIM. O *contig* formado que continha o gene *bla_{VIM-1}* possuía apenas 1.394 pb, sendo praticamente o tamanho do gene *bla_{VIM-1}* que possui 954 pb. Nenhum grupo de incompatibilidade pode ser relacionado.

Outra amostra sequenciada foi a 5.36A, que foi escolhida por também apresentar o gene *bla_{VIM-1}* e poder ser comparada com a amostra 2.16C. Para esse isolado, o *contig* onde o *bla_{VIM-1}* estava presente também foi pequeno (1.298 pb) e não apresentava o *replicon* do plasmídeo.

A cepa 5.36A foi isolada no hospital A da região 5, de uma amostra de urina de um paciente do sexo masculino de 83 anos. O TSA mostrou resistência a todos os antimicrobianos com exceção da amicanina e das polimixinas B e E, e demonstrou um perfil MDR, possível XDR.

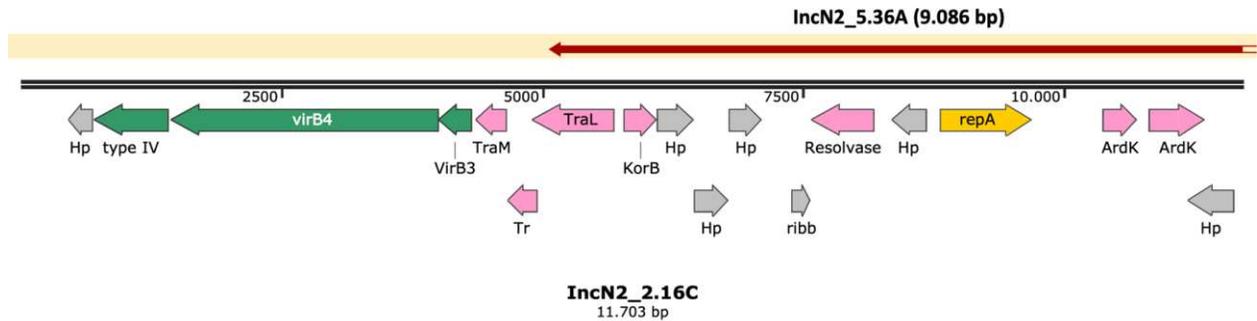
Além do *bla*_{VIM-1} mencionado, a PCR detectou os genes para β -lactameses: *bla*_{CTXM-1}, *bla*_{SHV} e *bla*_{TEM}. Com a análise do resistoma foi possível observar vários outros genes de resistência além dos detectados pela PCR, conferindo resistência aos aminoglicosídeos [*aac(3)-IIa*, *aac(6')-Ib3*, *aadA1*, *aph(3')-Ia*, *aph(3')-XV*]; à fosfomicina (*fosA*); aos macrolídeos [*mph(A)*]; às quinolonas [*aac(6')-Ib-cr*, *oqxA*, *oqxB*, *qnrB19*]; à rifampicina (*ARR-3*); à sulfonamida (*sul1*, *sul2*) e ao trimetoprim (*dfrA26*).

Assim como os isolados 1.4A (ST437) e 2.16C (ST340), a *K. pneumoniae* 5.36A (ST11) foi classificada no complexo clonal mais predominante dessa espécie, o CC258. Foram encontrados 3 plasmídeos através do PlasmidFinder, o ColRNAI, IncN2 e IncR.

Nos dois isolados que apresentaram o gene *bla*_{VIM-1} (2.16C e 5.36A) um plasmídeo IncN2 estava presente, mas não apresentou um gene de resistência no mesmo *contig*. O IncN2 do isolado 2.16C foi recuperado em um *contig* com 11.703 pb e no isolado 5.36A apresentou 9.086 pb. Uma hipótese é que o *bla*_{VIM-1} desses isolados esteja localizado no plasmídeo IncN2, que está presente nos dois isolados que possuem esse gene de resistência. O gene *bla*_{VIM-1} já foi descrito em grupos de incompatibilidade do tipo IncN, IncA/C, IncL/M, IncL e IncR (CARATTOLI, 2013, MATSUMURA, PEIRANO, *et al.*, 2018).

Foi realizado o alinhamento das duas sequências de plasmídeos IncN2 para avaliar a similaridade (Figura 13). Apesar de apresentar uma sequência menor, o plasmídeo IncN2 de 9.086 pb do isolado 5.36A apresenta 100% de similaridade com o do isolado 2.16C.

Figura 13. Alinhamento dos plasmídeos IncN2 dos isolados 2.16C e 5.36A.



A parte em vermelho da sequência 5.36A representa os 9.086 bp que possuem 100% de similaridade com a sequência IncN2 do isolado 2.16C. Em amarelo é representado o *replicon* do plasmídeo, em verde estão representados os genes do sistema de secreção do tipo IV e em rosa os outros genes de manutenção do plasmídeo. As proteínas hipotéticas estão representadas em cinza.

Fonte: elaborada pela autora com o programa SnapGene®.

O isolado de *K. pneumoniae* 5.5B foi escolhido para o sequenciamento do genoma completo pois apresentou na técnica de PCR os mesmos genes que o isolado 1.4A (*bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M1}) e possuía a coprodução de duas carbapenemases, a KPC e NDM. Porém, o sequenciamento não detectou a presença do gene *bla*_{NDM}, somente do *bla*_{KPC}. Uma hipótese é que a amostra possa ter perdido o plasmídeo que continha o gene *bla*_{NDM} devido ao congelamento prolongado e processos de descongelamento para realização das diversas técnicas do estudo, já que o sequenciamento foi uma das últimas metodologias realizadas. Com o resultado do sequenciamento negativo para o gene *bla*_{NDM}, a PCR foi repetida com o mesmo DNA utilizado da primeira vez que essa reação foi realizada, dando novamente o resultado positivo. Ao realizar uma nova extração de DNA para repetição da PCR, o resultado para *bla*_{NDM} foi negativo, favorecendo a hipótese de perda desse plasmídeo.

A cepa 5.5B foi isolada no hospital B da região 5, de uma amostra de líquido de um paciente do sexo feminino de 63 anos. No TSA foi resistente à maioria dos antimicrobianos testados com exceção da amicacina, gentamicina, nitrofurantoína e polimixinas B e E, sendo classificada como MDR, possível XDR. Na tipagem pelo PFGE foi classificada no grupo de similaridade A e apresentou uma amostra clonal.

O sequenciamento do isolado 5.5B permitiu a identificação do ST17 que faz parte do complexo clonal CC16-17, sendo diferente das outras amostras de *K. pneumoniae* do CC258. O

ST17 também é frequentemente encontrado em *K. pneumoniae* produtora da enzima KPC no Brasil (AIRES, PEREIRA, *et al.*, 2020). Na análise do resistoma apresentou genes de resistência às fluoroquinolonas [*oqxA*, *qnrB2*, *oqxB* e *aac(6')-Ib-cr*]; aos aminoglicosídeos [*aac(6')-Ib-cr*]; à rifampicina (*ARR-3*); aos folatos (*sull1*), aos fenicóis (*catB3* e *catA1*), aos β-lactâmicos (*bla_{TEM-1}*, *bla_{KPC-2}* e *bla_{OXA-1}*) e à fosfomicina (*fosA*).

Os plasmídeos detectados nesse isolado foram o Col(pHAD28), IncFIB, IncFII, IncM1 e IncR. Infelizmente, pelo mesmo motivo dos outros isolados, não foi possível estabelecer uma relação entre genes de resistência de grupos de incompatibilidade.

O resistoma dos 5 isolados utilizando a ferramenta ResFinder 4.0 detectou vários genes que explicam o fenótipo de resistência encontrado no TSA. No quadro 12 é possível ver a relação do genótipo de cada um dos isolados com o fenótipo de resistência. O isolado de *P. aeruginosa* 2.1A possui o gene *crpP* que confere resistência a ciprofloxacina, mas não apresentou o fenótipo no TSA.

Quadro 12. Relação do perfil genotípico (Resistoma) com o fenotípico (TSA).

Antimicrobianos	Perfil	Pa 2.1A	Kp 1.4A	Kp 2.16C	Kp 5.36A	Kp 5.5B
β-lactâmicos	Genotípico	<i>bla_{OXA-50}</i> , <i>bla_{PAO}</i> e <i>bla_{KPC-2}</i>	<i>bla_{OXA-9}</i> , <i>bla_{OXA-1}</i> , <i>bla_{KPC}</i> , <i>bla_{NDM}</i> , <i>bla_{TEM}</i> , <i>bla_{SHV}</i> e <i>bla_{CTX-M1}</i>	<i>lac_{CTX-M-15}</i> , <i>bla_{NDM-1}</i> , <i>bla_{OXA-1}</i> , <i>bla_{SHV-182}</i> , <i>bla_{TEM-1C}</i> e <i>bla_{VIM-1}</i>	<i>bla_{VIM}</i> , <i>bla_{CTXM-15}</i> , <i>bla_{SHV}</i> e <i>bla_{TEM}</i>	<i>bla_{TEM-1}</i> , <i>bla_{KPC-2}</i> e <i>bla_{OXA-1}</i>
	Fenotípico	IPM, ETP e CZD	ETP, MEN, IPM, CXN, COX, FEP, CXM, CRO, FOX e CZD	ETP, MEN, IPM, CXN, COX, FEP, CXM, CRO, FOX e CZD	ETP, MEN, CXN, COX, FEP, CXM, CRO, FOX e CZD	ETP, CXN, COX, FEP, CXM, CRO, FOX e CZD
Aminoglicosídeos	Genotípico	<i>aph(3')-Iib</i>	<i>aadA1</i> , <i>aac(6')-Ib3</i> , <i>aadA2b</i> , <i>aph(6)-Id</i> , <i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aac(3)-II</i> e <i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>aac(3)-IId</i> , <i>aac(6')-Ib3</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA2</i> , <i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aph(3')-XV</i> , <i>aph(6)-Id</i> e <i>aph(6)-Id</i>	<i>aac(3)-IIa</i> , <i>aac(6')-Ib3</i> , <i>aadA1</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>aph(3')-XV</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>
	Fenotípico	GMN	TMN e GMN	TMN e GMN	TMN e GMN	TMN
Fosfomicina	Genotípico	<i>fosA</i>	<i>fosA</i>	<i>fosA</i>	<i>fosA</i>	<i>fosA</i>
	Fenotípico	NT	NT	NT	NT	NT
Fenicóis	Genotípico	<i>catB7</i>	<i>catB3</i> , <i>cmlA1</i> , <i>catB3</i>	<i>catB3</i>	-	<i>catB3</i> e <i>catA1</i>
	Fenotípico	NT	NT	NT	NT	NT

Quinolonas	Genotípico	<i>crpP</i>	<i>oqxB, aac(6')-Ib-cr e oqxA</i>	<i>aac(6')-Ib-cr, oqxA, oqxB, qnrB19 e qnrB2</i>	<i>aac(6')-Ib-cr, oqxA, oqxB, qnrB19</i>	<i>oqxA, qnrB2, oqxB e aac(6')-Ib-cr</i>
	Fenotípico	Sensível à CIP, NXN e LVX	CIP, NXN, LVX e NAL	CIP, NXN, LVX e NAL	CIP, NXN, LVX e NAL	CIP, NXN, LVX e NAL
Macrolídeos	Genotípico	-	<i>mph(A)</i>	<i>erm(B) e mph(A)</i>	<i>mph(A)</i>	-
	Fenotípico	NT	NT	NT	NT	NT
Sulfonamidas	Genotípico	-	<i>sul1, dfrA15, sul2 e dfrA30</i>	<i>sul1 e sul2</i>	<i>sul1 e sul2</i>	<i>sul1</i>
	Fenotípico	NT	SXT	SXT	SXT	SXT
Tetraciclina	Genotípico	-	<i>tet(A), tet(C), tet(D)</i>	<i>tet(A)</i>	-	-
	Fenotípico	NT	NT	NT	NT	NT
Rifampicina	Genotípico	-	-	<i>ARR-3</i>	<i>ARR-3</i>	<i>ARR-3</i>
	Fenotípico	NT	NT	NT	NT	NT
Trimetoprim	Genotípico	-	-	<i>dfrA12 e dfrA14</i>	<i>dfrA26</i>	-
	Fenotípico	Não testado	SXT	SXT	SXT	SXT

AKN, amicacina; AMC, amoxicilina/ácido clavulânico; AMP, ampicilina; ATM, aztreonam; CIP, ciprofloxacina; COX, cefotaxima; CRO, ceftriaxona; CXM, cefuroxima; CXN, cefalexina; CZD, ceftaxidima; ETP, ertapenem; FEP, cefepime; FOX, cefoxitina; GMN, gentamicina; IPM, imipenem; LVX, levofloxacina; MEM, meropenem; NAL, ácido nalidíxico; NFE, nitrofurantoína; NXN, norfloxacina; PTZ, piperacilina/tazobactam; SAM, ampicilina/sulbactam; SXT, sulfametoxazol/trimetoprim; TMN, tobramicina; NT, não testado; Pa, *Pseudomonas aeruginosa*; Kp, *Klebsiella pneumoniae*.

Com as análises dos sequenciamentos foi possível entender melhor o contexto genético dos isolados sequenciados e descobrir a que complexos clonais pertenciam, além da análise *in silico* do resistoma que detectou diversos genes que explicam a grande resistência que esses isolados apresentaram no TSA. Foi possível associar o IncU ao gene *bla_{KPC}* no isolado de *P. aeruginosa*, mas infelizmente não foi possível fazer a relação dos genes *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}* e *bla_{VIM}* com grupos de incompatibilidade de plasmídeos. Estabelecer essas relações foi bastante desafiador, principalmente pela limitação do sequenciamento de sequências curtas. Novas abordagens de sequenciamento precisam ser realizadas, uma cobertura maior do sequenciamento com mais 500 mil *reads* pode ser necessária. O sequenciamento de sequências longas, como da Oxford NanoporeTM, pode ser uma opção para fazer uma montagem híbrida desses isolados, a fim de se conseguir montar a sequência inteira dos plasmídeos ou pelo menos afirmar a que grupo de incompatibilidade os genes de resistência pertencem. Essa técnica de sequenciamento não foi possível de ser realizada a tempo para o manuscrito, mas será concluída posteriormente no próprio laboratório de Microbiologia Molecular Aplicada (MIMA) no qual a tese foi desenvolvida.

4.6 FEEDBACK PARA O LACEN/SC

A técnica de PCR em tempo real que foi padronizada para este trabalho foi repassada para os colaboradores do LACEN/SC. As técnicas de pipetagem, análise das curvas de *melting* e dos dados foram ensinados para 2 funcionários do serviço de bacteriologia do LACEN/SC. Os protocolos das metodologias foram encaminhados e o relatório com os resultados foram apresentados para o estado.

5 CONCLUSÃO

A produção de genes de resistência pelas bactérias Gram-negativas do grupo ESKAPE constituem uma séria preocupação global encontrada na maioria dos países. A disseminação de vários mecanismos de resistência encontrados em espécies diferentes, além dos novos tipos que são detectados, reduzem as opções terapêuticas disponíveis para tratar infecções causadas por essas bactérias. O cenário mundial é de amplo surgimento e disseminação de bactérias multirresistentes, com cada vez mais relatos de pandroga resistência, em um mundo onde já não se tem antimicrobianos capazes de tratar bactérias que são resistentes a todos os antimicrobianos disponíveis. Além disso, o extenso uso de antimicrobianos na medicina humana, animal e na pecuária, agrava ainda mais esse cenário.

A proposta do presente estudo foi de caracterizar isolados resistentes aos carbapenêmicos de bactérias Gram-negativas do grupo ESKAPE do estado de Santa Catarina e, com isso, entender a disseminação dessas bactérias no estado, quais os genes de resistência encontrados e o contexto genético de alguns isolados.

De janeiro de 2018 a janeiro de 2019, 153 isolados de 5 regiões do estado de Santa Catarina foram estudados, sendo a maioria (76%) de bactérias não-fermentadoras da glicose (*A. baumannii* e *P. aeruginosa*) e em menor quantidade de enterobactérias (*K. pneumoniae* e *Enterobacter* spp.)

Os 31 isolados de *K. pneumoniae* foram classificados em sua maioria como MDR, possível XDR (77,4%) tendo 9 isolados resistentes às polimixinas. Essa espécie foi a que mais apresentou genes de resistência diferentes, totalizando 10 tipos, em que o mais encontrado foi *bla_{SHV}* e a carbapenemase mais observada foi a NDM. O PFGE classificou os isolados em 27 genótipos formando 6 grupos de similaridade com 3 perfis clonais entre essa espécie. Foi observado que as cepas, além de estarem espalhadas entre as regiões estado, também estão permanecendo por vários meses dentro dos hospitais.

Quatro isolados de *Enterobacter* spp. foram classificados como XDR e um como MDR, todos os XDR apresentaram resistência às polimixinas. O gene mais encontrado foi *bla_{TEM}* e a carbapenemase foi a KPC. Foram encontrados 3 genótipos de similaridade sendo que um apresentou isolados clonais.

Dos 66 isolados de *A. baumannii*, 62% foram classificados como XDR e todos foram positivos para o gene constitutivo *bla_{OXA-51}*, 92% para *bla_{OXA-23}* e 6 isolados com *bla_{OXA-24}*, sendo

que um dos isolados apresentou a coprodução de duas oxacilinases, *bla*_{OXA-23} e *bla*_{OXA-24}. A identificação do gene *bla*_{OXA-24} é pouco relatada e no estado de Santa Catarina não há relatos da presença desse gene ou da coprodução das duas oxacilinases em um mesmo isolado. O PFGE classificou os isolados em 38 genótipos que formaram 8 grupos de similaridade, observou-se 12 perfis clonais entre os isolados. Foi observada a circulação de cepas clonais e intimamente relacionadas entre as regiões do estado e hospitais, bem como a permanência dessas cepas por vários meses nos hospitais.

Dos 51 isolados de *P. aeruginosa* a maioria foi classificado como XDR e MDR. O gene *bla*_{CTX-M2} foi o mais encontrado e um isolado apresentou a produção da carbapenemase KPC, que é pouco comum nessa espécie. Os isolados foram classificados em 45 genótipos distintos que formaram 11 grupos de similaridade e foram observados 5 perfis clonais. Apesar da maior heterogeneidade é possível observar uma grande circulação de cepas intimamente e possivelmente relacionadas entre as regiões do estado e a permanência por vários meses nos hospitais.

Alguns isolados, em sua maioria de *K. pneumoniae*, foram sequenciados pois carregavam múltiplos genes de resistência, 3 deles faziam parte do complexo clonal CC258 que é considerado um clone disseminado no mundo todo. Destacam-se dois isolados de *K. pneumoniae* com duas carbapenemases, um com KPC e NDM, e outro com NDM e VIM. A espécie de *K. pneumoniae* com coprodução das metalo- β -lactamases NDM e VIM do presente estudo é primeiro relatado genômico do Brasil. Outro isolado que chamou a atenção foi o isolado de *P. aeruginosa* ST312 que possuía o gene *bla*_{KPC} em um plasmídeo IncU, essa associação nunca foi descrita e esse é o primeiro relato genômico de *P. aeruginosa* com *bla*_{KPC} do Sul do Brasil.

O estudo de isolados Gram-negativos do grupo ESKAPE em várias regiões é pioneiro no estado de Santa Catarina, com os dados obtidos foi possível entender um pouco da dinâmica da circulação dessas espécies e seus genes de resistência no estado. Dessa maneira, foi possível contribuir com dados epidemiológicos que poderão ser utilizados para um melhor controle de disseminação dessas bactérias que são consideradas um grave problema de saúde pública e são relacionadas com as IRAS.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, I, CERQUEIRA, G. M., BHUIYAN, S., *et al.* "Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* : laboratory challenges, mechanistic insights and therapeutic strategies", **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 11, n. 4, p. 395–409, 10 abr. 2013.
- ABRÃO, M. G., BILLERBECK, A. E. C., NISHI, M. Y., *et al.* "Padronização da técnica de extração de DNA de células de mucosa oral com NaCl: aplicação no estudo do gene PROP1", **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 49, n. 6, p. 978–982, dez. 2005.
- AH, Y.-M., KIM, A.-J., LEE, J.-Y. "Colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*", **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 44, n. 1, p. 8–15, jul. 2014.
- ÅHMAN, J., MATUSCHEK, E., KAHLMETER, G. "The quality of antimicrobial discs from nine manufacturers—EUCAST evaluations in 2014 and 2017", **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 3, p. 346–352, mar. 2019.
- AIRES, C. A. M., PEREIRA, P. S., ASENSI, M. D., *et al.* "mgrB Mutations Mediating Polymyxin B Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Rectal Surveillance Swabs in Brazil", **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 11, p. 6969–6972, nov. 2016.
- AIRES, C. A. M., PEREIRA, P. S., DE ARAUJO, C. F. M., *et al.* "Multiclonal Expansion of *Klebsiella pneumoniae* Isolates Producing NDM-1 in Rio de Janeiro, Brazil.", **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 4, 6 abr. 2017.
- AIRES, C. A. M., PEREIRA, P. S., ROCHA-DE-SOUZA, C. M., *et al.* "Population Structure of KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Surveillance Rectal Swabs in Brazil", **Microbial Drug Resistance**, v. 26, n. 6, p. 652–660, 1 jun. 2020.
- ANDERSSON, D. I., HUGHES, D. "Persistence of antibiotic resistance in bacterial populations", **FEMS Microbiology Reviews**, v. 35, n. 5, p. 901–911, set. 2011.
- ANDRADE, L. N., VITALI, L., GASPAR, G. G., *et al.* "Expansion and Evolution of a Virulent, Extensively Drug-Resistant (Polymyxin B-Resistant), QnrS1-, CTX-M-2-, and KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 International High-Risk Clone", **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 7, p. 2530–2535, 1 jul. 2014.
- ANTÃO, E.-M., VINCZE, S., HANKE, R., *et al.* "Antibiotic resistance, the 3As and the road ahead", **Gut Pathogens**, v. 10, n. 1, p. 52, 2018.
- ANTIPOV, D., HARTWICK, N., SHEN, M., *et al.* "plasmidSPAdes: assembling plasmids from whole genome sequencing data.", **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 32, n. 22, p. 3380–3387, 15 jul. 2016. DOI: 10.1093/bioinformatics/btw493.
- ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Indicadores Nacionais de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde**, 2010.
- ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Nota Técnica No 01/2013 medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multiresistentes**, 2013a.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Nota Técnica No 01/2014. Vigilância e Monitoramento das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência Microbiana (RM) em serviços de saúde, 2014.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa nacional de Prevenção de Controle de Infecções Relacionadas à Assistência a Saúde (2016-2020), 2016.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa Nacional de Prevenção e Controle de Infecções Relacionadas à Assistência á Saúde (PNPCIRAS) 2013 – 2015, 2013b.

ARZANLOU, M., CHAI, W. C., VENTER, H. "Intrinsic, adaptive and acquired antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria", **Essays In Biochemistry**, v. 61, n. 1, p. 49–59, 28 mar. 2017.

ASHKENAZI HOFFNUNG, L., BURDELOVA, E., ADLER, A. "Evaluation of two commercial real-time PCR assays for detection of carbapenemase genes in Enterobacteriaceae", **Journal of Medical Microbiology**, v. 66, n. 11, p. 1612–1615, 1 nov. 2017.

BANERJEE, R., HUMPHRIES, R. "Clinical and laboratory considerations for the rapid detection of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae.", **Virulence**, v. 8, n. 4, p. 427–439, 2017.

BANKEVICH, A., NURK, S., ANTIPOV, D., *et al.* "SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing", **Journal of Computational Biology**, v. 19, n. 5, p. 455–477, maio 2012.

BARGUIGUA, A., EL OTMANI, F., LAKBAKBI EL YAAGOUBI, F., *et al.* "First report of a Klebsiella pneumoniae strain coproducing NDM-1, VIM-1 and OXA-48 carbapenemases isolated in Morocco.", **APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, v. 121, n. 7, p. 675–7, jul. 2013.

BARNES, M. D., WINKLER, M. L., TARACILA, M. A., *et al.* "Klebsiella pneumoniae carbapenemase-2 (KPC-2), substitutions at ambler position Asp179, and resistance to ceftazidime-avibactam: Unique antibiotic-resistant phenotypes emerge from β -lactamase protein engineering", **mBio**, 2017.

BARTOLLETI, F., SECO, B. M. S., CAPUZZO DOS SANTOS, C., *et al.* "Polymyxin B Resistance in Carbapenem-Resistant Klebsiella pneumoniae, São Paulo, Brazil.", **Emerging infectious diseases**, v. 22, n. 10, p. 1849–51, out. 2016.

BATEMAN, A. "UniProt: a worldwide hub of protein knowledge", **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D506–D515, 8 jan. 2019.

BAUERNFEIND, A., SCHWEIGHART, S., GRIMM, H. "A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of Escherichia coli", **Infection**, v. 18, n. 5, p. 294–298, set. 1990.

BEDENIĆ, B., SARDELIĆ, S., LUXNER, J., *et al.* "Molecular characterization of class b carbapenemases in advanced stage of dissemination and emergence of class d carbapenemases in Enterobacteriaceae from Croatia.", **Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 43, p. 74–82, set. 2016.

BEN, R.-J., YANG, M.-C., HSUEH, J.-C., *et al.* "Molecular characterisation of multiple drug-resistant Acinetobacter baumannii isolates in southern Taiwan", **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 38, n. 5, p. 403–408, nov. 2011.

- BEVAN, E. R., JONES, A. M., HAWKEY, P. M. "Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype", **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 8, p. 2145–2155, 1 ago. 2017.
- BLAIR, J. M. A., WEBBER, M. A., BAYLAY, A. J., *et al.* **Molecular mechanisms of antibiotic resistance**. **Nature Reviews Microbiology**, v.13, p. 42-51, jan. 2015
- BONDY-DENOMY, Joe, PAWLUK, A., MAXWELL, K. L., *et al.* "Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR/Cas bacterial immune system", **Nature**, v. 493, n. 7432, p. 429–432, 16 jan. 2013.
- BONDY-DENOMY, Joseph. "Protein Inhibitors of CRISPR-Cas9", **ACS Chemical Biology**, v. 13, n. 2, p. 417–423, 16 fev. 2018.
- BONNET, R., SAMPAIO, J. L. M., LABIA, R., *et al.* "A novel CTX-M β -lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant Enterobacteriaceae isolated in Brazil", **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 7, p. 1936-42, jul. 2000.
- BORAL, B., UNALDI, Ö., ERGIN, A., *et al.* "A prospective multicenter study on the evaluation of antimicrobial resistance and molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections in intensive care units with clinical and environmental features", **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 18, n. 1, p. 19, 2 dez. 2019.
- BORTOLAIA, V., KAAS, R. S., RUPPE, E., *et al.* "ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes", **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 11 ago. 2020.
- BOTELHO, J., GROSSO, F., PEIXE, L. "Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* – Mechanisms, epidemiology and evolution", **Drug Resistance Updates**, v. 44, p. 100640, maio 2019.
- BRASIL. **Portaria n. 2.616, de 12 de maio de 1998. Expede diretrizes e normas para a prevenção e o controle das infecções hospitalares. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 1998.**
- BRCAST. **Método de Disco-Difusão para Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos**, 2017.
- BRCAST. **Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos . Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing**, 2020.
- BROWN, E. D., WRIGHT, G. D. "Antibacterial drug discovery in the resistance era", **Nature**, v. 529, n. 7586, p. 336–343, 20 jan. 2016.
- BUSH, K. "The ABCD's of β -lactamase nomenclature.", **Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy**, v. 19, n. 4, p. 549–59, ago. 2013.
- BUSH, K., JACOBY, G. A. **Updated functional classification of β -lactamases**. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969-76, 1 mar. 2010.
- CAMPANA, E. H., XAVIER, D. E., PETROLINI, F. V.-B., *et al.* "Carbapenem-resistant and cephalosporin-susceptible: a worrisome phenotype among *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Brazil", **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 57–62, jan. 2017.
- CARATTOLI, A. "Plasmids and the spread of resistance", **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 6–7, p. 298–304, ago. 2013.

CARATTOLI, A., ZANKARI, E., GARCÍA-FERNANDEZ, A., *et al.* "PlasmidFinder and pMLST: in silico detection and typing of plasmids", **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2014.

CARDIFF, R. D., WARD, J. M., BARTHOLD, S. W. "'One medicine—one pathology': are veterinary and human pathology prepared?", **Laboratory Investigation**, v. 88, n. 1, p. 18–26, 26 jan. 2008.

CARRARA-MARRONI, F. E., CAYÔ, R., STRELING, A. P., *et al.* "Emergence and spread of KPC-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a Brazilian teaching hospital", **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 3, n. 4, p. 304–306, dez. 2015.

CARVALHO-ASSEF, A. P. D. alincour., PEREIRA, P. S., ALBANO, R. M., *et al.* "Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil", **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 12, p. 2956–2957, 1 dez. 2013.

CASTILHO, S. R. A., GODOY, C. S. D. M., GUILARDE, A. O., *et al.* "*Acinetobacter baumannii* strains isolated from patients in intensive care units in Goiânia, Brazil: Molecular and drug susceptibility profiles", **PLOS ONE**, v. 12, n. 5, p. e0176790, 5 maio 2017.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention Antibiotic Use in the United States, 2017: Progress and Opportunities, 2017.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013.

CECISS. Secretaria de Estado da Saúde. Boletim Epidemiológico CECISS No 01 Avaliação dos indicadores estaduais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Microrganismos relacionados a essas infecções, entre os anos de 2011 a 2017 nas UTIs de Santa Catarina, 2018.

CHAGAS, T. P. G., CARVALHO, K. R., DE OLIVEIRA SANTOS, I. C., *et al.* "Characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Brazil (2008–2011): countrywide spread of OXA-23-producing clones (CC15 and CC79)", **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 79, n. 4, p. 468–472, ago. 2014.

CHEW, K. L., LA, M.-V., LIN, R. T. P., *et al.* "Colistin and Polymyxin B Susceptibility Testing for Carbapenem-Resistant and *mcr* -Positive Enterobacteriaceae: Comparison of Sensititre, MicroScan, Vitek 2, and Etest with Broth Microdilution", **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 9, p. 2609–2616, set. 2017.

CLSI. M100-Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 2020.

CORTIVO, G. D., GUTBERLET, A., FERREIRA, J. A., *et al.* "Antimicrobial resistance profiles and oxacillinase genes in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from hospitalized patients in Santa Catarina, Brazil", **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 6, p. 699–705, dez. 2015.

COX, G., WRIGHT, G. D. "Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions", **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 6–7, p. 287–292, ago. 2013.

CUAICAL-RAMOS, N. M., MONTIEL, M., MARCANO ZAMORA, D. "Variabilidad genética de *Klebsiella pneumoniae* con carbapenemasa tipo KPC proveniente de diferentes estados de Venezuela", **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 37, n. 2, p. 76–81, fev. 2019.

- CUZON, G., NAAS, T., VILLEGAS, M.-V., *et al.* "Wide Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* Producing β -Lactamase bla KPC-2 Gene in Colombia", **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 11, p. 5350–5353, nov. 2011.
- D., L., X., G., H., Z., *et al.* "Distribution and antimicrobial resistance of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*", **Chinese Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 15, p. 175–177, 2015.
- D'ANDREA, M. M., ARENA, F., PALLECCHI, L., *et al.* "CTX-M-type β -lactamases: A successful story of antibiotic resistance", **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 6–7, p. 305–317, ago. 2013.
- DA NOGUEIRA, K. S., CONTE, D., MAIA, F. V., *et al.* "Distribution of extended-spectrum β -lactamase types in a Brazilian tertiary hospital", **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 2, abril. 2015.
- DALMOLIN, T. V., MAZZETTI, A., ÁVILA, H., *et al.* "Elution methods to evaluate colistin susceptibility of Gram-negative rods", **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 96, n. 1, p. 114910, jan. 2020.
- DE AZEVEDO, F. K. S. F., DUTRA, V., NAKAZATO, L., *et al.* "Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection in two hospitals in Central Brazil: the role of ST730 and ST162 in clinical outcomes", **Journal of Medical Microbiology**, v. 68, n. 1, p. 31–40, 1 jan. 2019.
- DE OLIVEIRA SANTOS, I. C., ALBANO, R. M., ASENSI, M. D., *et al.* "Draft genome sequence of KPC-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* recovered from a bloodstream infection sample in Brazil", **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 15, p. 99–100, dez. 2018.
- DE OLIVEIRA SANTOS, I. C., PEREIRA DE ANDRADE, N. F., DA CONCEIÇÃO NETO, O. C., *et al.* "Epidemiology and antibiotic resistance trends in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Rio de Janeiro - Brazil: Importance of mutational mechanisms over the years (1995–2015)", **Infection, Genetics and Evolution**, v. 73, p. 411–415, set. 2019.
- DE OLIVEIRA, D. V., VAN DER SAND, S. T. "Phenotypic Tests for the Detection of β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae Isolated from Different Environments", **Current Microbiology**, v. 73, n. 1, p. 132–138, 12 jul. 2016.
- DE PAULA-PETROLI, S. B., CAMPANA, E. H., BOCCHI, M., *et al.* "Early detection of a hypervirulent KPC-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST235 in Brazil", **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 12, p. 153–154, mar. 2018.
- DEGLMANN, R. C., KOBS, V. C., OLIVEIRA, D. de, *et al.* "Earliest identification of New Delhi metallo- β -lactamase 1 (NDM-1) in *Acinetobacter pittii* in Brazil", **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, p. e20180348, 27 jun. 2019.
- DEURENBERG, R. H., BATHOORN, E., CHLEBOWICZ, M. A., *et al.* "Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention.", **Journal of biotechnology**, v. 243, p. 16–24, 10 fev. 2017.
- DIAGO-NAVARRO, E., CHEN, L., PASSET, V., *et al.* "Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Exhibit Variability in Capsular Polysaccharide and Capsule Associated Virulence Traits", **The Journal of Infectious Diseases**, v. 210, n. 5, p. 803–813, 1 set. 2014.

DOI, Y., IOVLEVA, A., BONOMO, R. A. "The ecology of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the developed world", **Journal of Travel Medicine**, v. 24, n. suppl_1, p. S44–S51, 1 abr. 2017.

DORTET, L., POIREL, L., NORDMANN, P. "Worldwide dissemination of the NDM-Type carbapenemases in Gram-negative bacteria", **BioMed Research International**, v. 2014, mar. 2014.

DUBOIS, V., ARPIN, C., NOURY, P., *et al.* "Prolonged outbreak of infection due to TEM-21-producing strains of *Pseudomonas aeruginosa* and enterobacteria in a nursing home", **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 8, p. 4129–4138, 1 ago. 2005.

DURMAZ, R., OTLU, B., KOKSAL, F., *et al.* "The optimization of a rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for the typing of *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp.", **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 5, n. 62, p. 372–377, 2009.

DZIRI, R., AYARI, I., BARGUELLIL, F., *et al.* "First Report of NDM and VIM Coproducing *Klebsiella pneumoniae* in Tunisia and Emergence of Novel Clones.", **Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)**, v. 25, n. 9, p. 1282–1286, 1 nov. 2019.

ECDC. **European Centre for Disease Prevention and Control. Annual epidemiological report: Reporting on 2009 surveillance data and 2010 epidemic intelligence data.** European Centre for Disease Prevention and Control, Stockholm, 2011.

ECDC. **European Centre for Disease Prevention and Control. Annual epidemiological report on communicable diseases in Europe 2008.** European centre for disease prevention and control, 2008.

ECDC. **European Centre for Disease Prevention and Control. ECDC strategic framework for the integration of molecular and genomic typing into European surveillance and multi-country outbreak investigations – 2019–2021**, 2019.

ECDC. **European Centre for Disease Prevention and Control. Expert opinion on whole genome sequencing for public health surveillance**, 2016.

ENDIMIANI, A., LUZZARO, F., MIGLIAVACCA, R., *et al.* "Spread in an Italian hospital of a clonal *Acinetobacter baumannii* strain producing the TEM-92 extended-spectrum β -lactamase", **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 6, p. 2211–4, jun. 2007.

EUCAST. **European Centre for Disease Prevention and Control. Redefinição das categorias dos testes de sensibilidade S, I e R**, 2019.

EVANS, B. A., AMYES, S. G. B. "OXA -Lactamases", **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 2, p. 241–263, 1 abr. 2014.

FERNANDES, M. R., MOURA, Q., SARTORI, L., *et al.* "Silent dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contribute to the global spread of the *mcr-1* gene", **Eurosurveillance**, v. 21, n. 17, p. 30214, 28 abr. 2016.

FERREIRA, R. L., DA SILVA, B. C. M., REZENDE, G. S., *et al.* "High Prevalence of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Harboring Several Virulence and β -Lactamase Encoding Genes in a Brazilian Intensive Care Unit", **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 22 jan. 2019.

FOUNOU, R. C., FOUNOU, L. L., ESSACK, S. Y. "Clinical and economic impact of antibiotic resistance in developing countries: A systematic review and meta-analysis.", **PloS one**, v. 12, n. 12, p. e0189621, 21 dez. 2017.

FOUNOU, R. C., FOUNOU, L. L., ESSACK, S. Y. "Extended spectrum beta-lactamase mediated resistance in carriage and clinical gram-negative ESKAPE bacteria: a comparative study between a district and tertiary hospital in South Africa.", **Antimicrobial resistance and infection control**, v. 7, n. 1, p. 134, 14 dez. 2018.

FOXMAN, B., ZHANG, L., KOOPMAN, J. S., *et al.* "Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies", **Epidemiologic Perspectives and Innovations**, nov. 2005.

FUHRMEISTER, A. S., JONES, R. N. "The Importance of Antimicrobial Resistance Monitoring Worldwide and the Origins of SENTRY Antimicrobial Surveillance Program", **Open Forum Infectious Diseases**, v. 6, n. Supplement_1, p. S1–S4, 15 mar. 2019.

GALES, A. C., CASTANHEIRA, M., JONES, R. N., *et al.* "Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008–2010)", **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, n. 4, p. 354–360, ago. 2012.

GALES, A. C., JONES, R. N., SADER, H. S. "Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006-09).", **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 66, n. 9, p. 2070–4, 1 set. 2011.

GALES, BOLMSTRÖM, SAMPAIO, *et al.* "Antimicrobial Susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* Producing Extended-Spectrum beta-lactamase (ESBL) Isolated in Hospitals in Brazil.", **The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 1, n. 4, p. 196–203, ago. 1997.

GIACOBBE, D. R., DEL BONO, V., TRECARICHI, E. M., *et al.* "Risk factors for bloodstream infections due to colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: results from a multicenter case–control–control study", **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, n. 12, p. 1106.e1-1106.e8, dez. 2015.

GRIFFITH, D. R., RAYMOND, P. A. "Multiple-source heterotrophy fueled by aged organic carbon in an urbanized estuary", **Marine Chemistry**, v. 124, n. 1–4, p. 14–22, 2011.

HAQUE, M., SARTELLI, M., MCKIMM, J., *et al.* "Health care-associated infections - an overview.", **Infection and drug resistance**, v. 11, p. 2321–2333, 2018.

HIGGINS, P. G., LEHMANN, M., SEIFERT, H. "Inclusion of OXA-143 primers in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp.", **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 35, n. 3, p. 305, mar. 2010.

HOLT, K. E., WERTHEIM, H., ZADOKS, R. N., *et al.* "Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health", **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2015.

HUMPHRIES, R. M., GREEN, D. A., SCHUETZ, A. N., *et al.* "Multicenter Evaluation of Colistin Broth Disk Elution and Colistin Agar Test: a Report from the Clinical and Laboratory Standards Institute", **Journal of Clinical Microbiology**, v. 57, n. 11, 11 set. 2019.

- IOVLEVA, A., DOI, Y. "Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae.", **Clinics in laboratory medicine**, v. 37, n. 2, p. 303–315, 2017.
- JOUSSET, A. B., BERNABEU, S., BONNIN, R. A., *et al.* "Development and validation of a multiplex polymerase chain reaction assay for detection of the five families of plasmid-encoded colistin resistance", **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 53, n. 3, p. 302-309, mar. 2019.
- KARVANEN, M., MALMBERG, C., LAGERBÄCK, P., *et al.* "Colistin Is Extensively Lost during Standard In Vitro Experimental Conditions.", **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 11, 11 nov. 2017.
- KEMPF, M., ROLAIN, J.-M. "Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options", **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 39, n. 2, p. 105–114, fev. 2012.
- KHAN, H. A., BAIG, F. K., MEHBOOB, R. "Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance", **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 5, p. 478–482, maio 2017.
- KLEVENS, R. M., EDWARDS, J. R., RICHARDS, C. L., *et al.* "Estimating Health Care-Associated Infections and Deaths in U.S. Hospitals, 2002", **Public Health Reports**, v. 122, n. 2, p. 160–166, 2 mar. 2007.
- KLIEBE, C., NIES, B. A., MEYER, J. F., *et al.* "Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins.", **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 28, n. 2, p. 302–307, 1 ago. 1985.
- KLOCKGETHER, J., CRAMER, N., WIEHLMANN, L., *et al.* "Pseudomonas aeruginosa Genomic Structure and Diversity", **Frontiers in Microbiology**, v. 2, 2011.
- KRIZOVA, L., POIREL, L., NORDMANN, P., *et al.* "TEM-1 β -lactamase as a source of resistance to sulbactam in clinical strains of *Acinetobacter baumannii*", **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 12, p. 2786–2791, 1 dez. 2013.
- KUBISTA, M., ANDRADE, J., BENGTSSON, M., *et al.* "The real-time polymerase chain reaction", **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 2–3, p. 95–125, 2006.
- KUMAR, K. R., COWLEY, M. J., DAVIS, R. L. "Next-Generation Sequencing and Emerging Technologies", **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v. 45, n. 07, p. 661–673, 16 out. 2019.
- KUMARASAMY, K., KALYANASUNDARAM, A. "Emergence of *Klebsiella pneumoniae* isolate co-producing NDM-1 with KPC-2 from India", **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 1, p. 243–244, 1 jan. 2012.
- KUO, H.-Y., YANG, C.-M., LIN, M.-F., *et al.* "Distribution of blaOXA-carrying imipenem-resistant *Acinetobacter* spp. in 3 hospitals in Taiwan", **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 66, n. 2, p. 195–199, fev. 2010.
- LABARCA, J. A., SALLES, M. J. C., SEAS, C., *et al.* "Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in the nosocomial setting in Latin America.", **Critical reviews in microbiology**, v. 42, n. 2, p. 276–92, 27 ago. 2016.

LACEN/CECISS. **Nota Técnica 01/2016/CECISS/LACEN. Estabelece o Plano de gerenciamento das ações a ser adotado pelos Serviços de Saúde públicos e privados para redução de Eventos Adversos Infeciosos – Infecção Relacionada à Assistência a Saúde–IRAS e Resist**, 2016.

LAMERS, R. P., BURROWS, L. L. "Pseudomonas aeruginosa : targeting cell-wall metabolism for new antibacterial discovery and development", **Future Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 9, p. 975–992, jun. 2016.

LARSEN, M. V., COSENTINO, S., RASMUSSEN, S., *et al.* "Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria", **Journal of Clinical Microbiology**, 2012.

LEE, C.-R., LEE, J. H., PARK, K. S., *et al.* "Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods", **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 13 jun. 2016.

LEE, C.-R., LEE, J. H., PARK, M., *et al.* "Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options.", **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7, p. 55, 13 mar. 2017.

LEE, H.-W., KOH, Y. M., KIM, J., *et al.* "Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces", **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. 1, p. 49–54, jan. 2008.

LEE, J. H., PARK, K. S., KARIM, A. M., *et al.* **How to minimise antibiotic resistance. The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 17-18, jan. 2016.

LIMA, W. G., SILVA ALVES, G. C., SANCHES, C., *et al.* **Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in patients with burn injury: A systematic review and meta-analysis. Burns**, v. 45, n.7, p. 1495-1508, nov. 2019.

LIU, Y.-Y., WANG, Y., WALSH, T. R., *et al.* "Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study.", **The Lancet. Infectious diseases**, v. 16, n. 2, p. 161–8, fev. 2016.

LONGO, L. G. A., DE SOUSA, V. S., KRAYCHETE, G. B., *et al.* "Colistin resistance emerges in pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* epidemic clones in Rio de Janeiro, Brazil", **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 54, n. 5, p. 579–586, nov. 2019.

LORENZONI, V. V., RUBERT, F. da C., RAMPELOTTO, R. F., *et al.* "Increased antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae* from a University Hospital in Rio Grande do Sul, Brazil", **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 5, p. 676–679, out. 2018.

LYON, J. A. "Imipenem/cilastatin: the first carbapenem antibiotic", **Drug Intell Clin Pharm**, v. 19, n. 12, p. 895–9, 1985.

MACVANE, S. H. "Antimicrobial Resistance in the Intensive Care Unit", **Journal of Intensive Care Medicine**, v. 32, n. 1, p. 25–37, 7 jan. 2017.

MAGIORAKOS, A. P., SRINIVASAN, A., CAREY, R. B., *et al.* "Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance", **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268–281, 2012.

- MARKS, M., KROUPA, P. "Dynamical population synthesis: Constructing the stellar single and binary contents of galactic field populations", **Clinical Microbiology and Infection**, 13 set. 2011.
- MARTINEZ, E., BUSTAMANTE, A., MENON, R., *et al.* "Whole-genome sequencing of Mycobacterium tuberculosis for rapid diagnostics: feasibility of a decentralised model", **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 4, n. 4, p. e13–e14, abr. 2016.
- MATSUMURA, Y., PEIRANO, G., BRADFORD, P. A., *et al.* "Genomic characterization of IMP and VIM carbapenemase-encoding transferable plasmids of Enterobacteriaceae", **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 11, p. 3034–3038, 1 nov. 2018.
- MERINO, L. A. "[Pseudomonas aeruginosa: a bacterium with multiple personalities].", **Revista Argentina de microbiologia**, v. 39, n. 3, p. 143, 2007.
- MIRANDA, C. C., DE FILIPPIS, I., PINTO, L. H., *et al.* "Genotypic characteristics of multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa from hospital wastewater treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil", **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 6, p. 1276–1286, 1 jun. 2015.
- MOHD SAZLLY LIM, S., SIME, F. B., ROBERTS, J. A. "Multidrug-resistant Acinetobacter baumannii infections: Current evidence on treatment options and the role of pharmacokinetics/pharmacodynamics in dose optimisation", **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 53, n. 6, p. 726–745, jun. 2019.
- MONTEIRO, J., SANTOS, A. F., ASENSI, M. D., *et al.* "First Report of KPC-2-Producing Klebsiella pneumoniae Strains in Brazil", **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 1, p. 333–334, 1 jan. 2009.
- MORRILL, H. J., POGUE, J. M., KAYE, K. S., *et al.* "Treatment Options for Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infections", **Open Forum Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, 1 abr. 2015.
- MUNOZ-PRICE, L. S., POIREL, L., BONOMO, R. A., *et al.* **Clinical epidemiology of the global expansion of Klebsiella pneumoniae carbapenemases. The Lancet Infectious Diseases**, v.13, n. 9, p. 785-96, sep. 2013.
- NAAS, T., BONNIN, R. A., CUZON, G., *et al.* "Complete sequence of two KPC-harboring plasmids from Pseudomonas aeruginosa", **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 8, p. 1757–1762, 1 ago. 2013.
- NEMEC, A., KŘÍŽOVÁ, L., MAIXNEROVÁ, M., *et al.* "Emergence of carbapenem resistance in Acinetobacter baumannii in the Czech Republic is associated with the spread of multidrug-resistant strains of European clone II", **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, n. 3, p. 484-9, set. 2008.
- NORDMANN, P., POIREL, L. "The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide.", **Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 20, n. 9, p. 821–30, set. 2014.
- NUÑEZ QUEZADA, T., RODRÍGUEZ, C. H., CASTRO CAÑARTE, G., *et al.* "Outbreak of bla OXA-72 -producing Acinetobacter baumannii in South America", **Journal of Chemotherapy**, v. 29, n. 5, p. 321–324, 3 set. 2017.
- O'NEILL, C. B. J. "Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations", **Review on Antimicrobial Resistance**, 2016.

- ORLEK, A., STOESEER, N., ANJUM, M. F., *et al.* "Plasmid Classification in an Era of Whole-Genome Sequencing: Application in Studies of Antibiotic Resistance Epidemiology", **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 9 fev. 2017.
- PADOVEZE, M. C., FORTALEZA, C. M. C. B. "Healthcare-associated infections: challenges to public health in Brazil.", **Revista de saude publica**, v. 48, n. 6, p. 995–1001, dez. 2014.
- PAGANO, M., ROCHA, L., SAMPAIO, J. L. M., *et al.* "Emergence of OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* Belonging to High-Risk Clones (CC15 and CC79) in Different Brazilian States", **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 38, n. 2, p. 252–254, 6 fev. 2017.
- PANG, Z., RAUDONIS, R., GLICK, B. R., *et al.* "Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies", **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 1, p. 177–192, jan. 2019.
- PAPAGIANNITSIS, C. C., MALLI, E., FLOROU, Z., *et al.* "Emergence of sequence type 11 *Klebsiella pneumoniae* coproducing NDM-1 and VIM-1 metallo- β -lactamases in a Greek hospital", **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 87, n. 3, p. 295–297, mar. 2017.
- PARDUCHO, K. R., BEADELL, B., YBARRA, T. K., *et al.* "The Antimicrobial Peptide Human Beta-Defensin 2 Inhibits Biofilm Production of *Pseudomonas aeruginosa* Without Compromising Metabolic Activity", **Frontiers in Immunology**, v. 11, 8 maio 2020.
- PASTOR-SATORRAS, R., VESPIGNANI, A. "Epidemic spreading in scale-free networks", **Future Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 9, p. 975–992, 20 out. 2000.
- PATERSON, D. L., BONOMO, R. A. "Extended-Spectrum β -Lactamases: a Clinical Update", **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 4, p. 657–686, 1 out. 2005.
- PATON, R., MILES, R. S., HOOD, J., *et al.* "ARI 1: β -lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*", **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 2, n. 2, p. 81–87, fev. 1993.
- PEIRANO, G., PITOUT, J. D. D. "Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae: Update on Molecular Epidemiology and Treatment Options", **Drugs**, v. 79, n. 14, p. 1529–1541, 12 set. 2019.
- PELEG, A. Y., SEIFERT, H., PATERSON, D. L. "*Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen", **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 3, p. 538–582, 1 jul. 2008.
- PEREIRA, P. S., DE ARAUJO, C. F. M., SEKI, L. M., *et al.* "Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340)", **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 2, p. 312–316, 1 fev. 2013.
- PESESKY, M. W., HUSSAIN, T., WALLACE, M., *et al.* "KPC and NDM-1 genes in related enterobacteriaceae strains and plasmids from Pakistan and the United States", **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 6, p. 1034–1037, jun. 2015.
- PICÃO, R. C., POIREL, L., GALES, A. C., *et al.* "Further identification of CTX-M-2 extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*.", **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 5, p. 2225–6, maio 2009.

- PIPERAKI, E.-T., SYROGIANNOPOULOS, G. A., TZOUVELEKIS, L. S., *et al.* "Klebsiella pneumoniae", **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 36, n. 10, p. 1002–1005, out. 2017.
- POIREL, L., NAAS, T., NORDMANN, P. "Diversity, Epidemiology, and Genetics of Class D - Lactamases", **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 1, p. 24–38, 1 jan. 2010.
- POLOTTO, M., CASELLA, T., DE LUCCA OLIVEIRA, M. G., *et al.* "Detection of *P. aeruginosa* harboring bla CTX-M-2, bla GES-1 and bla GES-5, bla IMP-1 and bla SPM-1 causing infections in Brazilian tertiary-care hospital", **BMC Infectious Diseases**, v. 3, ago. 2012.
- POTTER, R. F., D'SOUZA, A. W., DANTAS, G. "The rapid spread of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae", **Drug Resistance Updates**, v. 29, p. 30–46, nov. 2016.
- RAHMAN, M., SHUKLA, S. K., PRASAD, K. N., *et al.* "Prevalence and molecular characterisation of New Delhi metallo- β - lactamases NDM-1, NDM-5, NDM-6 and NDM-7 in multidrug-resistant Enterobacteriaceae from India", **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 44, n. 1, p. 30-7, jul. 2014.
- RAMSAMY, Y., ESSACK, S. Y., SARTORIUS, B., *et al.* "Antibiotic resistance trends of ESKAPE pathogens in Kwazulu-Natal, South Africa: A five-year retrospective analysis.", **African journal of laboratory medicine**, v. 7, n. 2, p. 887, 2018.
- RANJBAR, R., FARAHANI, A. "Study of genetic diversity, biofilm formation, and detection of Carbapenemase, MBL, ESBL, and tetracycline resistance genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from burn wound infections in Iran", **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 8, n. 1, p. 172, 7 dez. 2019.
- RIBEIRO, Á. C. da S., CROZATTI, M. T. L., SILVA, A. A. da, *et al.* "Pseudomonas aeruginosa in the ICU: prevalence, resistance profile, and antimicrobial consumption", **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, p. e20180498, 2020.
- RICE, L. B. "Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE", **The Journal of Infectious Diseases**, v. 197, n. 8, p. 1079–1081, 15 abr. 2008.
- ROJAS, L. J., SALIM, M., COBER, E., *et al.* "Colistin Resistance in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*: Laboratory Detection and Impact on Mortality.", **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 64, n. 6, p. 711–718, 15 dez. 2017.
- ROMANIN, P., PALERMO, R. L., CAVALINI, J. F., *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.", **Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)**, v. 25, n. 9, p. 1365–1373, 1 nov. 2019.
- ROZALES, F. P., RIBEIRO, V. B., MAGAGNIN, C. M., *et al.* "Emergence of NDM-1-producing Enterobacteriaceae in Porto Alegre, Brazil.", **International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases**, v. 25, p. 79–81, ago. 2014.
- RUPPÉ, É., WOERTHER, P.-L., BARBIER, F. "Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli.", **Annals of intensive care**, v. 5, n. 1, p. 61, dez. 2015.

SABAT, A. J., BUDIMIR, A., NASHEV, D., *et al.* "Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance.", **Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin**, v. 18, n. 4, p. 20380, 24 jan. 2013.

SADER, H. S., RHOMBERG, P. R., FARRELL, D. J., *et al.* "Differences in potency and categorical agreement between colistin and polymyxin B when testing 15,377 clinical strains collected worldwide", **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 83, n. 4, p. 379–381, dez. 2015.

SAMPAIO, J. L. M., GALES, A. C. "Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brazil: focus on β -lactams and polymyxins", **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. Suppl 1, p. 31–37, dez. 2016.

SANTAJIT, S., INDRAWATTANA, N. "Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens.", **BioMed research international**, v. 2016, p. 2475067, 2016.

SATLIN, M. J. "The Search for a Practical Method for Colistin Susceptibility Testing: Have We Found It by Going Back to the Future?", **Journal of Clinical Microbiology**, v. 57, n. 2, 21 nov. 2018.

SAUNDERS, L. Z. "Virchow's contributions to veterinary medicine: Celebrated then, forgotten now", **Veterinary Pathology**, v. 37, n. 3, p. 199–207, 26 maio 2000.

SCHIMITH BIER, K. E., LUIZ, S. O., SCHEFFER, M. C., *et al.* "Temporal evolution of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Curitiba, southern Brazil", **American Journal of Infection Control**, v. 38, n. 4, p. 308–314, maio 2010.

SEEMANN, T. "Prokka: rapid prokaryotic genome annotation", **Bioinformatics**, v. 30, n. 14, p. 2068–2069, 15 jul. 2014.

SEJAS, L. M., SILBERT, S., REIS, A. O., *et al.* "Avaliação da qualidade dos discos com antimicrobianos para testes de disco-difusão disponíveis comercialmente no Brasil", **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 1, 2003.

SHEHREEN, S., CHYOU, T., FINERAN, P. C., *et al.* "Genome-wide correlation analysis suggests different roles of CRISPR-Cas systems in the acquisition of antibiotic resistance genes in diverse species", **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 374, n. 1772, p. 20180384, 13 maio 2019.

SHI, L., LIANG, Q., FENG, J., *et al.* "Coexistence of two novel resistance plasmids, blaKPC-2-carrying p14057A and tetA(A)-carrying p14057B, in *Pseudomonas aeruginosa*.", **Virulence**, v. 9, n. 1, p. 306–311, 2018.

SHINTANI, M., SANCHEZ, Z. K., KIMBARA, K. "Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy", **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 31 mar. 2015.

SHORTRIDGE, D., GALES, A. C., STREIT, J. M., *et al.* "Geographic and Temporal Patterns of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Over 20 Years From the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997–2016", **Open Forum Infectious Diseases**, v. 6, n. Supplement_1, p. S63–S68, 15 mar. 2019.

SIMNER, P. J., BERGMAN, Y., TREJO, M., *et al.* "Two-Site Evaluation of the Colistin Broth Disk Elution Test to Determine Colistin *In Vitro* Activity Against Gram-Negative Bacilli", **Journal of Clinical Microbiology**, 2018.

SKARIYACHAN, S., TASKEEN, N., GANTA, M., *et al.* "Recent perspectives on the virulent factors and treatment options for multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*", **Critical Reviews in Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 315–333, 4 maio 2019.

SNITKIN, E. S., ZELAZNY, A. M., THOMAS, P. J., *et al.* "Tracking a Hospital Outbreak of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* with Whole-Genome Sequencing", **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 148, p. 148ra116-148ra116, 22 ago. 2012.

TARTARI, D. C. **Rastreo, identificação e caracterização genética de *Acinetobacter* spp. isolados de ambiente hospitalar.** Programa de Pós-graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, 2016.

TENOVER, F. C., ARBEIT, R. D., GOERING, R. V., *et al.* **Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed- field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing.** **Journal of Clinical Microbiology**, 1995.

THORNTON, B., BASU, C., "Rapid and Simple Method of qPCR Primer Design". **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1275. p. 173–179, 2015.

TRAGLIA, G. M., CHUA, K., CENTRON, D., *et al.* "Whole-genome sequence analysis of the naturally competent *Acinetobacter baumannii* clinical isolate A118", **Genome Biology and Evolution**, v. 26, n. 9, p. 2235-9, ago. 2014.

TRECARICHI, E. M., TUMBARELLO, M. "Therapeutic options for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections.", **Virulence**, v. 8, n. 4, p. 470–484, 19 maio 2017.

VASOO, S., BARRETO, J. N., TOSH, P. K. "Emerging Issues in Gram-Negative Bacterial Resistance", **Mayo Clinic Proceedings**, v. 90, n. 3, p. 395–403, mar. 2015.

VILA, J., PACHÓN, J. "Therapeutic options for *Acinetobacter baumannii* infections: an update", **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 13, n. 16, p. 2319–2336, 4 nov. 2012.

VILLEGAS, M. V., LOLANS, K., CORREA, A., KATTAN, J. N., LOPEZ, J. A., QUINN, J. P., *et al.* "First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase.", **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 4, p. 1553–5, abr. 2007.

VILLEGAS, M. V., LOLANS, K., CORREA, A., KATTAN, J. N., LOPEZ, J. A., QUINN, J. P. "First Identification of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Producing a KPC-Type Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase", **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 4, p. 1553–1555, abr. 2007.

WERNECK, J. S., PICAIO, R. C., CARVALHAES, C. G., *et al.* "OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* in Brazil: a case report", **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 2, p. 452–454, 1 fev. 2011.

WHO. **World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance**, 2014a.

WHO. **World Health Organization. Global Action Plan on Antimicrobial Resistance**, 2015a.

WHO. World Health Organization. **Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery and development of new antibiotics**, 2017.

WHO. World Health Organization. **Health care-associated infections Fact Sheet**, 2014b.

WHO. World Health Organization. **Health care without avoidable infections: The critical role of infection prevention and control**, 2016.

WHO. World Health Organization. **Report on the Burden of Endemic Health Care-Associated Infection Worldwide**, 2011.

WHO. World Health Organization. **Worldwide country situation analysis: response to antimicrobial resistance**, 2015b.

WHO, FAO, OIE. **WHO, World Health Organization; FAO, Food And Agriculture Organization Of The United Nations; OIE, World Organization For Animal Health. Antimicrobial Resistance - A manual for developing national action plans. Versão 1**, 2016.

WIELAND, K., CHHATWAL, P., VONBERG, R.-P. "Nosocomial outbreaks caused by *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* : Results of a systematic review", **American Journal of Infection Control**, v. 46, n. 6, p. 643–648, jun. 2018.

WILLIAMS, M., "Real-time polymerase chain reaction". In: BUSTIN, S. A. (Org.), **The PCR Revolution**, Cambridge, Cambridge University Press, 2009. p. 3–11.

WISE, M. G., ESTABROOK, M. A., SAHM, D. F., *et al.* "Prevalence of *mcr*-type genes among colistin-resistant Enterobacteriaceae collected in 2014-2016 as part of the INFORM global surveillance program", **PLOS ONE**, v. 13, n. 4, p. e0195281, 2 abr. 2018.

WYRES, K. L., LAM, M. M. C., HOLT, K. E. "Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*.", **Nature reviews. Microbiology**, v. 18, n. 6, p. 344–359, 2020.

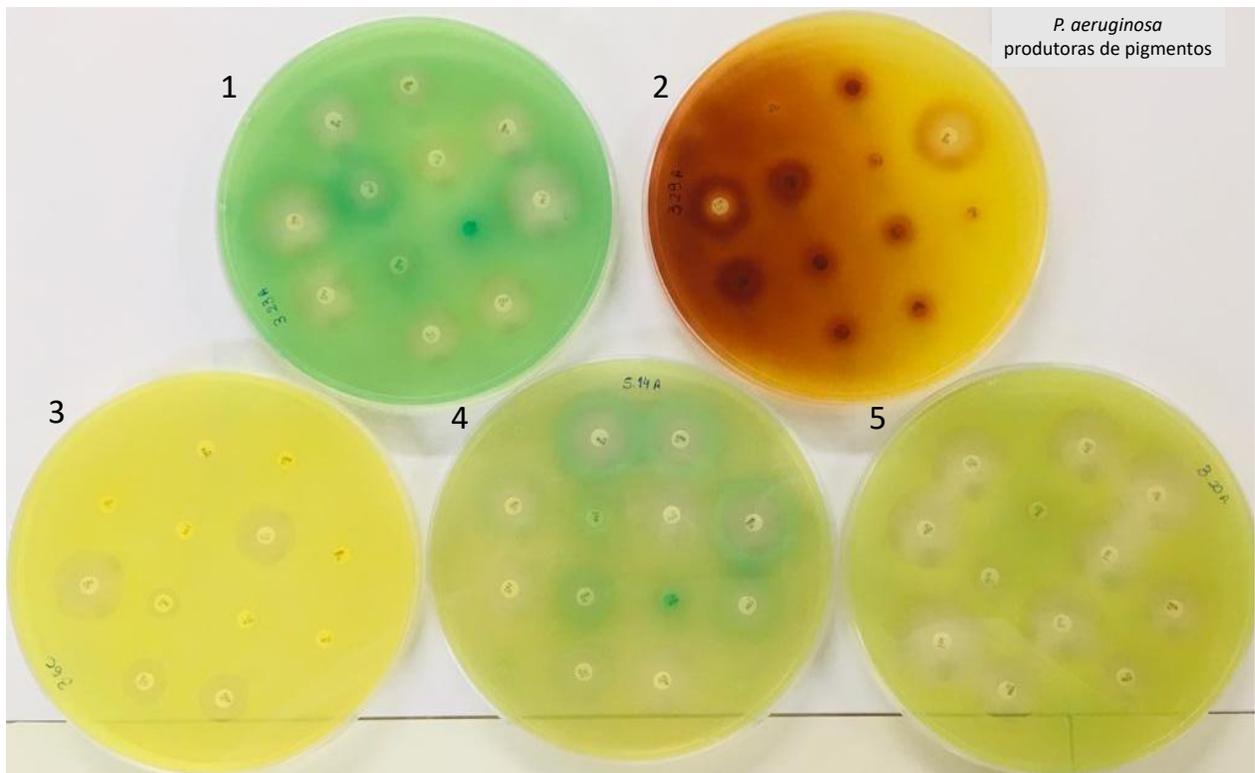
YANG, Q., RUI, Y. "Two Multiplex Real-Time PCR Assays to Detect and Differentiate *Acinetobacter baumannii* and Non-*baumannii* *Acinetobacter* spp. Carrying *bla*NDM, *bla*OXA-23-Like, *bla*OXA-40-Like, *bla*OXA-51-Like, and *bla*OXA-58-Like Genes", **PLOS ONE**, v. 11, n. 7, p. e0158958, 8 jul. 2016.

YIGIT, H., QUEENAN, A. M., ANDERSON, G. J., *et al.* "Novel Carbapenem-Hydrolyzing -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*", **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 1151–1161, 1 abr. 2001.

YONG, D., TOLEMAN, M. A., GISKE, C. G., *et al.* "Characterization of a New Metallo- -Lactamase Gene, *bla*NDM-1, and a Novel Erythromycin Esterase Gene Carried on a Unique Genetic Structure in *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 14 from India", **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 12, p. 5046–5054, 1 dez. 2009.

ZAMPARETE, C. P. **Determinação fenotípica e genotípica de Beta-lactamases de Espectro Estendido em *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter* spp. de pacientes internados no Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU/UFSC)**. Programa de Pós-graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, 2014.

APÊNDICE A – Figura mostrando a produção de pigmentos em isolados de *P. aeruginosa*.



Isolado 2 é produtor de piorrubina e demais isolados (1, 3, 4 e 5) são produtores de piocianina e/ou pioverdina.

ANEXO A – Categorias de antimicrobianos que devem ser testadas para enterobactérias.

TABLE 3. Enterobacteriaceae; antimicrobial categories and agents used to define MDR, XDR and PDR (worksheet for categorizing isolates)

Antimicrobial category	Antimicrobial agent	Results of antimicrobial susceptibility testing (S or NS)	Species with intrinsic resistance to antimicrobial agents or categories (S1)*
Aminoglycosides	Gentamicin		<i>Providencia rettgeri</i> (<i>P. rettgeri</i>), <i>Providencia stuartii</i> (<i>P. stuartii</i>)
	Tobramycin		<i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i>
	Amikacin		
	Netilmicin		<i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i>
Anti-MRSA cephalosporins	Ceftaroline (approved only for <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i>)		
Anti-pseudomonal penicillins + β -lactamase inhibitors	Ticarcillin-clavulanic acid		<i>Excherichia hermannii</i> (<i>E. hermannii</i>)
	Piperacillin-tazobactam		<i>E. hermannii</i>
Carbapenems	Ertapenem		
	Imipenem		
	Meropenem		
	Doripenem		
Non-extended spectrum cephalosporins; 1st and 2nd generation cephalosporins	Cefazolin		<i>Citrobacter freundii</i> (<i>C. freundii</i>), <i>Enterobacter aerogenes</i> (<i>E. aerogenes</i>), <i>Enterobacter cloacae</i> (<i>E. cloacae</i>), <i>Hafnia alvei</i> (<i>H. alvei</i>), <i>Morganella morganii</i> (<i>M. morganii</i>), <i>Proteus penneri</i> (<i>P. penneri</i>), <i>Proteus vulgaris</i> (<i>P. vulgaris</i>), <i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i> , <i>Serratia marcescens</i> (<i>S. marcescens</i>)
	Cefuroxime		<i>M. morganii</i> , <i>P. penneri</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>S. marcescens</i>
Extended-spectrum cephalosporins; 3rd and 4th generation cephalosporins	Cefotaxime or ceftriaxone		
	Cefazidime		
	Cefepime		
Cephamycins	Cefoxitin		<i>C. freundii</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>H. alvei</i>
	Cefotetan		<i>C. freundii</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>H. alvei</i>
Fluoroquinolones	Ciprofloxacin		
Folate pathway inhibitors	Trimethoprim-sulphamethoxazole		
Glycylcyclines	Tigecycline		<i>M. morganii</i> , <i>Proteus mirabilis</i> (<i>P. mirabilis</i>), <i>P. penneri</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i>
Monobactams	Aztreonam		
Penicillins	Ampicillin		<i>Citrobacter koseri</i> (<i>C. koseri</i>), <i>C. freundii</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>E. hermannii</i> , <i>H. alvei</i> , <i>Klebsiella</i> spp., <i>M. morganii</i> , <i>P. penneri</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i> , <i>S. marcescens</i>
Penicillins + β -lactamase inhibitors	Amoxicillin-clavulanic acid		<i>C. freundii</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>H. alvei</i> , <i>M. morganii</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i> , <i>S. marcescens</i>
	Ampicillin-sulbactam		<i>C. freundii</i> , <i>C. koseri</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>H. alvei</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>S. marcescens</i>
Phenolics	Chloramphenicol		
Phosphonic acids	Fosfomicin		
Polymyxins	Colistin		<i>M. morganii</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>P. penneri</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i> , <i>S. marcescens</i>

TABLE 3. Continued

Antimicrobial category	Antimicrobial agent	Results of antimicrobial susceptibility testing (S or NS)	Species with intrinsic resistance to antimicrobial agents or categories (S1)*
Tetracyclines	Tetracycline		<i>M. morgani</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>P. penneri</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i>
	Doxycycline		<i>M. morgani</i> , <i>P. penneri</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i>
	Minocycline		<i>M. morgani</i> , <i>P. penneri</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i>
<p>Criteria for defining MDR, XDR and PDR in Enterobacteriaceae MDR: non-susceptible to ≥ 1 agent in ≥ 3 antimicrobial categories. XDR: non-susceptible to ≥ 1 agent in all but ≤ 2 categories. PDR: non-susceptible to all antimicrobial agents listed. *When a species has intrinsic resistance to an antimicrobial agent or to the whole category, that agent or category must be removed from the list in this table prior to applying the criteria for the definitions and should not be counted when calculating the number of agents or categories to which the bacterial isolate is non-susceptible. http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/diseaseprogrammes/ARHAI/Pages/public_consultation_clinical_microbiology_infection_article.aspx</p>			

Retirado do artigo Magiorakos e colaboradores (*Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance*).

ANEXO B – Categorias de antimicrobianos que devem ser testadas para *A. baumannii*.

TABLE 5. *Acinetobacter* spp.; antimicrobial categories and agents used to define MDR, XDR and PDR (worksheet for categorizing isolates)

Antimicrobial category	Antimicrobial agent	Results of antimicrobial susceptibility testing (S or NS)
Aminoglycosides	Gentamicin	
	Tobramycin	
	Amikacin	
	Netilmicin	
Antipseudomonal carbapenems	Imipenem	
	Meropenem	
	Doripenem	
Antipseudomonal fluoroquinolones	Ciprofloxacin	
	Levofloxacin	
Antipseudomonal penicillins + β -lactamase inhibitors	Piperacillin-tazobactam	
	Ticarcillin-clavulanic acid	
Extended-spectrum cephalosporins	Cefotaxime	
	Ceftriaxone	
	Ceftazidime	
	Cefepime	
Folate pathway inhibitors	Trimethoprim-sulphamethoxazole	
Penicillins + β -lactamase inhibitors	Ampicillin-sulbactam	
Polymyxins	Colistin	
	Polymyxin B	
Tetracyclines	Tetracycline	
	Doxycycline	
	Minocycline	
Criteria for defining MDR, XDR and PDR in <i>Acinetobacter</i> spp. MDR: non-susceptible to ≥ 1 agent in ≥ 3 antimicrobial categories. XDR: non-susceptible to ≥ 1 agent in all but ≤ 2 categories. PDR: non-susceptible to all antimicrobial agents listed. http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/diseaseprogrammes/ARHAI/Pages/public_consultation_clinical_microbiology_infection_article.aspx .		

Retirado do artigo Magiorakos e colaboradores (*Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance*).

ANEXO C – Categorias de antimicrobianos que devem ser testadas para *P. aeruginosa*.

Antimicrobial category	Antimicrobial agent	Results of antimicrobial susceptibility testing (S or NS)
Aminoglycosides	Gentamicin	
	Tobramycin	
	Amikacin	
	Netilmicin	
Antipseudomonal carbapenems	Imipenem	
	Meropenem	
	Doripenem	
Antipseudomonal cephalosporins	Ceftazidime	
	Cefepime	
Antipseudomonal fluoroquinolones	Ciprofloxacin	
	Levofloxacin	
Antipseudomonal penicillins + β -lactamase inhibitors	Ticarcillin-clavulanic acid	
	Piperacillin-tazobactam	
Monobactams	Aztreonam	
Phosphonic acids	Fosfomicin	
Polymyxins	Colistin	
	Polymyxin B	
Criteria for defining MDR, XDR and PDR in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> MDR: non-susceptible to ≥ 1 agent in ≥ 3 antimicrobial categories. XDR: non-susceptible to ≥ 1 agent in all but ≤ 2 categories. PDR: non-susceptible to all antimicrobial agents listed. http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/diseaseprogrammes/ARHAI/Pages/public_consultation_clinical_microbiology_infection_article.aspx		

TABLE 4. *Pseudomonas aeruginosa*; antimicrobial categories and agents used to define MDR, XDR and PDR (worksheet for categorizing isolates)

Retirado do artigo Magiorakos e colaboradores (*Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance*).

ANEXO D – Exemplos de padrões possíveis de sensibilidade antimicrobiana.

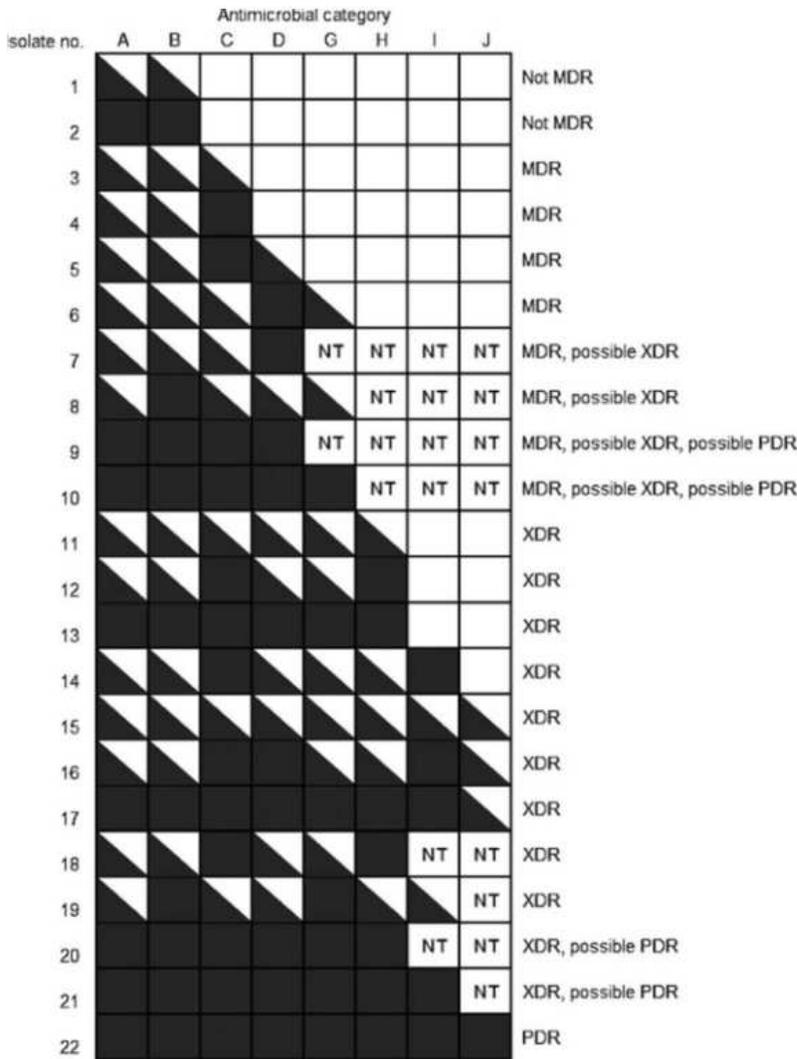


FIG. 2. Examples of 22 possible antimicrobial susceptibility patterns that can fall under the proposed definitions for MDR, XDR and PDR. □, the isolate is susceptible to all agents listed in category; ■, the isolate is non-susceptible to some, but not all agents listed in category; ■, the isolate is non-susceptible to all agents listed in category; □, the isolate was not tested for susceptibility to any agent listed in this category.

Retirado do artigo Magiorakos e colaboradores (*Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance*).