



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE BIOCÊNCIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA**

**Caracterização genética e bioquímica de isolados de *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* multidroga-resistente (MDR) e extensivamente-resistente (XDR) obtidos de dois hospitais públicos do Recife- Pernambuco, Brasil**

**ANA VITÓRIA ARAÚJO LIMA**

**RECIFE**

**2017**

**ANA VITÓRIA ARAÚJO LIMA**

**Caracterização genética e bioquímica de isolados de *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* multidroga-resistente (MDR) e extensivamente-resistente (XDR) obtidos de dois hospitais públicos do Recife- Pernambuco, Brasil**

Dissertação apresentada como um dos requisitos para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva-UFPE  
Coorientador: Profa. Dra. Maria Betânia Melo de Oliveira – UFPE

**RECIFE**

**2017**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD**

Lima, Ana Vitória Araújo

Caracterização genética e bioquímica de isolados de *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* multidroga-resistente (MDR) e extensivamente-resistente (XDR) obtidos de dois hospitais públicos do Recife-Pernambuco, Brasil / Ana Vitória Araújo Lima. – 2017.

57 f. : il., fig., tab.

Orientadora: Patrícia Maria Guedes Paiva.

Coorientadora: Maria Betânia Melo de Oliveira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Recife, 2017.

Inclui referências.

1. Infecção hospitalar 2. Bactérias 3. Biofilme I. Paiva, Patrícia Maria Guedes (orient.) II. Oliveira, Maria Betânia Melo de (coorient.) III. Título.

579.33

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2021 -384

**Caracterização genética e bioquímica de isolados de *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* multidroga-resistente (MDR) e extensivamente-resistente (XDR) obtidos de dois hospitais públicos do Recife- Pernambuco, Brasil**

**ANA VITÓRIA ARAÚJO LIMA**

Dissertação apresentada como um dos requisitos para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

**Banca Examinadora**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Maria Guedes Paiva  
Universidade Federal de Pernambuco  
Departamento de Bioquímica - UFPE

---

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão  
Universidade Federal de Pernambuco  
Departamento de Bioquímica – UFPE

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elba Verônica Matoso Maciel de Carvalho  
Universidade Federal de Pernambuco  
Departamento de Bioquímica - UFPE

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marcia Vanusa da Silva  
Universidade Federal de Pernambuco  
Departamento de Bioquímica – UFPE

Dedico a meus pais  
Severina Araújo e Josimar Lima  
e toda minha família.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida e sabedoria a mim concedidos.

A minha orientadora e co-orientadora, Patrícia Maria Guedes Paiva e Maria Betânia Melo de Oliveira por todos os ensinamentos passados, por oferecerem incentivos, compartilharem idéias, que influíram na construção deste trabalho, pela atenção, carinho e apoio.

À minha mãe e meu pai, por todo o esforço em me instruir em cada passo dado com muito amor, por terem feito tudo pela minha educação, e pelo exemplo de moral e boa conduta.

A todos meus familiares pelo carinho, apoio e torcida para que tudo desse certo.

Sou grata pela oportunidade de desenvolver meu trabalho e por todo o conhecimento que eu adquiri no Laboratório de Biologia Molecular. De modo, particular, aos companheiros de laboratório: Sivoneide, Júnior, Amanda, Cecília,

Bárbara, Camilla, Lívia, Bruno, Hortência, Priscilla, Clarissa, Daniel, Jan e todos os outros que acompanharam minha trajetória, pela ajuda e conhecimentos partilhados.

Aos meus amigos do Departamento de Bioquímica, em especial a Marlyete, Amália, George e Zé, aos meus amigos da UFPE, Anne, Laisy, Irassandra e Matheus por todo o carinho e por todos os momentos que passamos juntos.

Ao laboratório de Microbiologia e Entomologia do Instituto de Pesquisa Aggeu Magalhães – FIOCRUZ em especial à Rosângela Barbosa, Ana Carolina e Tereza Balbino.

Ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste - Cetene em especial à Túlio e Júlia.

Aos laboratórios de Microbiologia dos hospitais em especial a Kaleen e Felipe, pela disponibilidade e prestatividade.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica, que estão sempre predispostos a nos auxiliar.

À Pós-Graduação pelos serviços prestados e aos professores do Programa por auxiliar no aprimoramento dos nossos conhecimentos acadêmicos.

À todos que, mesmo não sendo aqui listados, tiveram participação nessa conquista, os meus mais sinceros agradecimentos.

Por fim, agradeço a UFPE e ao Departamento de Bioquímica pelo espaço cedido e aos órgãos de fomento, especialmente a CAPES, pelo apoio financeiro.

## RESUMO

A evolução de bactérias cada vez mais resistentes decorre de múltiplos fatores, que incluem o uso generalizado e por muitas vezes, inadequado de antimicrobianos. *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* são espécies de natureza ubíqua que possuem suscetibilidade diminuída a condições ambientais adversas como a dessecação, soluções desinfetantes, antissépticas e variações de temperatura, o que contribui para o seu potencial de transmissibilidade em ambientes hospitalares. O objetivo do presente trabalho foi investigar a ocorrência de  $\beta$ -lactamases em isolados de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* obtidos de dois hospitais públicos em Recife-PE, além de verificar sua capacidade para formação de biofilmes. A identificação de 100 isolados (35 de *A. baumannii* e 65 de *P. aeruginosa*) foi realizada pelo método automatizado Vitek<sup>®</sup>2 Compact (bioMérieux) e confirmada pela técnica MALDI-TOF-MS. Foram realizados experimentos moleculares por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção dos genes *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>* e *bla<sub>SHV</sub>*. Amostras de fragmentos amplificados foram purificadas e seqüenciadas para confirmação da identidade gênica. Foi avaliado, também, o potencial de formação de biofilme em diferentes meios de cultura: Luria Bertani Miller (LB Miller), Tryptose Soy Broth (TSB) ambos suplementados, ou não, com 1% de glicose (25%) pelo método Cristal Violeta. Como resultado, a identidade fenotípica dos isolados bacterianos foi confirmada pelo método MALDI-TOF-MS, demonstrando assim, a eficiência das técnicas utilizadas. Os isolados apresentaram perfis de resistência/suscetibilidade distintos, porém o maior índice de resistência para ambas as espécies foi detectado para o gene *bla<sub>KPC</sub>*, seguido do *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>* e *bla<sub>IMP</sub>*. O gene *bla<sub>KPC</sub>* apresentou positividade em 60 isolados (54.28% de *A. baumannii* e 63.07% de *P. aeruginosa*) enquanto que o gene *bla<sub>SHV</sub>* em 39 (22.85% de *A. baumannii* e 38.46% de *P. aeruginosa*). O *bla<sub>IMP</sub>* foi detectado em apenas um isolado de *A. baumannii* (2.85%) e o *bla<sub>VIM</sub>*, em oito (2.8% em *A. baumannii* e 7.69% em *P. aeruginosa*). Foi possível verificar a disseminação de bactérias Multidroga-Resistentes (MDR) e Extensivamente-Resistentes (XDR) em diferentes setores dos hospitais investigados. Todos os isolados foram sensíveis a polimixina, sendo essa a única opção terapêutica. Esses dados são alarmantes e indicam a elevada e crescente capacidade de adaptação destas espécies no ambiente hospitalar, demonstrando o aspecto problemático do tratamento e erradicação desses micro-organismos. Todos os isolados formaram biofilme nos meios testados, porém com diferentes intensidades. Não foi possível correlacionar o perfil de resistência com a capacidade de formação de biofilmes. Nas duas espécies investigadas, os isolados XDR, MDR e N-MDR foram encontrados como formadores fortes, moderados e fracos. A elevada diversidade de perfis microbianos de *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, observada nesse estudo, demonstra a dificuldade na escolha eficaz do tratamento para essas espécies e revela a necessidade de monitoramento contínuo, com vigilância epidemiológica destas infecções no ambiente hospitalar.

Palavras-chave: KPC; clones; disseminação de bactérias; ambiente hospitalar.

## ABSTRACT

The evolution of increasingly resistant bacteria stems from multiple factors, including widespread and often inadequate use of antimicrobials. *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* are species of ubiquitous nature that have decreased susceptibility to adverse environmental conditions such as desiccation, disinfecting solutions, antiseptics and temperature variations, which contributes to their potential for transmissibility in hospital settings. The objective of the present study was to investigate the occurrence of  $\beta$ -lactamases in isolates of *A. baumannii* and *P. aeruginosa* obtained from two public hospitals in Recife-PE, as well as to verify their capacity for biofilm formation. The identification of 100 isolates (35 of *A. baumannii* and 65 of *P. aeruginosa*) was performed using the automated Vitek®2 Compact method (bioMérieux) and confirmed by the MALDI-TOF-MS technique. Molecular experiments were carried out by means of the Polymerase Chain Reaction (PCR) for the detection of the *bla*<sub>KPC</sub> gene *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> and *bla*<sub>SHV</sub>. Samples of amplified fragments were purified and sequenced for confirmation of the gene identity. The potential of biofilm formation in different culture media was also evaluated: Luria Bertani Miller (LB Miller), Tryptose Soy Broth (TSB) both supplemented or not with 1% glucose or (25%) by the Crystal method Violet. As a result, the phenotypic identity of the bacterial isolates was confirmed by the MALDI-TOF-MS method, thus demonstrating the efficiency of the techniques used. The isolates presented distinct resistance / susceptibility profiles, but the highest resistance index for both species was detected for the *bla*<sub>KPC</sub> gene, followed by *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> and *bla*<sub>IMP</sub>. The *bla*<sub>KPC</sub> gene showed positivity in 60 isolates (54.28% of *A. baumannii* and 63.07% of *P. aeruginosa*) whereas the *bla*<sub>SHV</sub> gene in 39 (22.85% of *A. baumannii* and 38.46% of *P. aeruginosa*). The *bla*<sub>IMP</sub> was detected in only one isolate of *A. baumannii* (2.85%) and *bla*<sub>VIM</sub> in eight (2.8% in *A. baumannii* and 7.69% in *P. aeruginosa*). It was possible to verify the dissemination of Multidrug-Resistant (MDR) and Extensively Resistant (XDR) bacteria in different sectors of the hospitals investigated. All isolates were sensitive to polymyxin, which is the only therapeutic option. These data are alarming and indicate the high and increasing capacity of adaptation of these species in the hospital environment, demonstrating the problematic aspect of the treatment and eradication of these microorganisms. All the isolates formed biofilm in the media tested, but with different intensities. It was not possible to correlate the resistance profile with the biofilm formation capacity. All the isolates were sensitive to polymyxin, being the only therapeutical option. These data are alarming and indicate the high and increasing capacity of adaptation of these species in the hospital environment, demonstrating the problematic aspect of the treatment and eradication of these microorganisms. All the isolates formed biofilm in the media tested, but with different intensities. It was not possible to correlate the resistance profile with the biofilm formation capacity. In the two species investigated, isolates XDR, MDR and N-MDR were found to be strong, moderate and weak formers. The high diversity of microbial profiles of *A. baumannii* and *P. aeruginosa* observed in this study demonstrates the difficulty in the effective choice of treatment for these species and reveals the need for continuous monitoring with epidemiological surveillance of these infections in the hospital environment.

Key words: KPC; clones; dissemination of bacteria; hospital environment.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	12
2.1 Infecção Hospitalar.....	12
2.2 Resistência Bacteriana.....	13
2.3 Características gerais de <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	14
2.4 Características gerais de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	18
2.5 Características gerais dos $\beta$ -lactâmicos .....	22
2.6 Características gerais das $\beta$ -lactamases .....	25
2.7 Biofilme.....	28
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	31
3.1 Objetivo Geral .....	31
3.2 Objetivos Específicos .....	31
<b>4 ARTIGO - Ocorrência de <i>Acinetobacter baumannii</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, resistentes a drogas e formadores de biofilme intra e interhospitalares</b> .....	32
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	52
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	53

## 1. INTRODUÇÃO

A evolução de bactérias cada vez mais resistentes a antimicrobianos decorre de múltiplos fatores que incluem o uso generalizado e, por muitas vezes, inadequado de antimicrobianos. A resistência a esses antimicrobianos pode ocorrer por meio de dois mecanismos: mutação num *loci* cromossomal ou por transferência horizontal de genes, ou seja, por aquisição de genes de resistência presentes anteriormente em outros micro-organismos por meio de mecanismos de transdução, transformação ou conjugação. Essa transferência envolve, na maioria dos casos, aquisição de elementos genéticos como: plasmídeos, transposons e integrons. Outro fator que favorece o fenótipo de multiressistência é a resistência intrínseca, que pode ser explicada pela baixa permeabilidade da membrana celular externa a certos antibióticos, expressão constitutiva de algumas bombas de efluxo ou mesmo a interação destes dois mecanismos. Esses, separados ou em conjunto, favorecem a emergência e disseminação de micro-organismos resistentes possibilitando a disseminação de clones multirresistentes nos ambientes hospitalares e, em alguns casos no meio ambiente (ZHAO& HU, 2015; LU et. al., 2010).

Os antibióticos beta-lactâmicos englobam quatro famílias: penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos. Esses beta-lactâmicos são agentes bactericidas que inibem a síntese da parede celular. Esta é uma estrutura complexa composta de uma rede muito firme de moléculas de peptidoglicanos que tem por função a manutenção da forma celular bacteriana, protegendo-a de altas pressões osmóticas internas. Esses antibióticos sempre estiveram entre os primeiros agentes antimicrobianos disponíveis para o tratamento de doenças infecciosas, porém com o surgimento dos organismos resistentes foi necessário a utilização de compostos com atividade de largo espectro, como os carbapenêmicos (SILVA E LINCOPAN, 2012).

Dentre os patógenos responsáveis por provocar infecções hospitalares, destacam-se *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*: espécies de natureza ubíqua e que possuem suscetibilidade diminuída a condições ambientais adversas como a dessecação, às soluções desinfetantes, antissépticas e variações de temperatura, o que contribui para o seu potencial de transmissibilidade em ambientes hospitalares (CARVALHO et al., 2013).

Ainda que considerados como organismos de baixa virulência, espécies de *Acinetobacter* correspondem a patógenos nosocomiais que apresentam taxa de mortalidade em torno de 30% e parece possuir uma propensão a desenvolver resistência antibiótica muito rapidamente (LEE et al., 2011). Já *P. aeruginosa* é uma bactéria gram-negativa altamente virulenta. As infecções causadas por essas cepas costumam levar a óbito entre 40-60% dos casos, principalmente as estirpes multidroga-resistentes, MDR, (ROYER et al., 2015).

Os microrganismos patogênicos possuem vários mecanismos de virulência utilizados para induzir a infecção. Um desses mecanismos que merece destaque é a capacidade de aderir-se a uma superfície biótica ou abiótica para formar biofilme (LAMARI, CHAKROUN E RTIMI, 2017). Estudos vem mostrando divergência em relação as características de resistência/suscetibilidade dos micro-organismos e capacidade para formação de biofilme (Abidi et al, 2013; QUI *et al.*, 2016).

Este trabalho tem como objetivo investigar a ocorrência de genes de beta-lactamases em isolados bacterianos de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* obtidos de dois hospitais públicos em Recife-PE e verificar o seu potencial para formação de biofilme, a fim de contribuir com as políticas de saúde pública quanto à elaboração de estratégias de controle de surtos epidêmicos.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Infecção Hospitalar

Infecção hospitalar (IH) é considerada toda infecção que se desenvolve após internação ou causada por micro-organismos adquiridos enquanto o paciente está hospitalizado ou submetido a procedimentos invasivos (Portaria 2.616, publicada em 12 de maio de 1998 pelo Ministério da Saúde). A IH pode ser de origem endógena quando a microbiota do paciente é a causadora ou exógena, quando a origem é de fontes externas ao paciente (BRASIL, 1998; DUTRA *et al.*, 2015).

Nos últimos anos, o termo “Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde” (IRAS) vem sendo mais empregado, englobando todos os locais onde há prestação de cuidado e assistência à saúde. Portanto, o ambiente hospitalar não é o único local onde o paciente está passível de adquirir uma infecção, podendo haver risco em serviços de hemodiálise, procedimentos ambulatoriais, casas de repouso para idosos, assistência domiciliar (“home care”), clínicas odontológicas e instituições para doentes crônicos. Entretanto, para fins de estudos limitados ao ambiente hospitalar, o termo IH é ainda aceito (MENEZES *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2016).

IRAS atualmente é considerado como um dos mais importantes problemas de saúde pública e está diretamente relacionado ao aumento da mortalidade e incapacidade física temporária ou permanente. Além desses fatores, as IRAS estão intimamente associadas a procedimentos invasivos, sejam eles de diagnósticos ou terapêuticos, à gravidade da doença de base que acomete o paciente, ao sítio da infecção, à adequação da terapia e à sensibilidade dos micro-organismos aos antimicrobianos (SOUZA *et al.*, 2015).

No Brasil, aproximadamente cinco a 35% dos pacientes que dão entrada em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) adquirem algum tipo de IRAS, sendo esta a quarta causa de mortalidade no país (SANTOS *et al.*, 2016). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), UTIs de 1.692 hospitais, os quais apontaram a quantidade de incidência de Infecção Primária da Corrente Sanguínea Laboratorial (IPCSL) em UTI adulto, apresentaram uma média de 5,1 infecções a cada 1.000 Cateter Venoso Central (CVC)/dia. Nos pacientes pediátricos essa incidência foi de 5,5 infecções a cada 1.000 CVC/dia. Na UTI Neonatal, a densidade é inversamente proporcional à medida que o peso do paciente aumenta ao nascer (ANVISA, 2015).

A infecção mais comum e mais grave adquirida em ambiente hospitalar é a pneumonia, seguida de sepse, infecções de trato urinário, infecções de sítios cirúrgicos, dentre outras. Um dos problemas mais alarmantes é o aumento de bactérias cada vez mais resistentes a múltiplos antimicrobianos, elevando consideravelmente o índice de mortalidade e tempo de hospitalização dos

pacientes. O desprovimento de alternativas terapêuticas no combate às infecções nosocomiais severas, provocadas por bactérias multirresistentes, está diretamente relacionado as características adaptativas das bactérias de relevância clínica, frente a pressão exercida por diversos antibióticos na seletividade destes micro-organismos (LOREIRO *et al.*, 2016; OLIVEIRA; KOVNER; SILVA, 2010).

## 2.2 Resistência Bacteriana

Considerado um dos problemas de saúde pública mais relevantes, a resistência bacteriana aos antimicrobianos, decorre de múltiplos fatores e está diretamente relacionado ao aumento da morbidade e mortalidade de pacientes. O desenvolvimento de resistência bacteriana é um fenômeno natural, resultante da pressão seletiva pelo uso de antimicrobianos, mas que vem sendo acelerado principalmente pelo uso generalizado e, por muitas vezes, inadequado dos mesmos (LOREIRO *et al.*, 2016).

A resistência a esses antimicrobianos pode ocorrer por meio de vários mecanismos como mutação, transferência horizontal de genes, ou seja, aquisição de genes de resistência presentes anteriormente em outros micro-organismos por meio de mecanismos de transdução, transformação ou conjugação (VON WINTERSDORFF *et al.*, 2016). Essa transferência envolve, na maioria dos casos, aquisição de elementos genéticos móveis, como: plasmídeos, transposons e integrons. Outro fator que favorece o fenótipo de multiresistência é a resistência intrínseca, que pode ser explicada pela baixa permeabilidade da membrana celular externa a certos antibióticos, expressão constitutiva de algumas bombas de efluxo ou mesmo a interação destes dois mecanismos. Esses, separados ou em conjunto, favorecem a emergência e disseminação de micro-organismos resistentes possibilitando a disseminação de clones multirresistentes nos ambientes hospitalares e, em alguns casos no meio ambiente (ALÓS, 2015; ZHAO; HU, 2015; BARQUERO; TEDIM; COQUE, 2013; LU *et al.*, 2010).

O fenômeno de patógenos Multidroga-Resistentes (MDR) tem se tornado cada vez mais motivo de preocupação mundial, tanto em infecções nosocomiais quanto em infecções adquiridas na comunidade. Os patógenos MDR mais comuns e graves foram abrangidos pelo acrônimo "ESKAPE", que significa *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter spp.* Estes micro-organismos afetam principalmente pacientes imunocomprometidos (PATIÑO; CONTRERAS; LIMÓN, 2017; NATHWANI *et al.*, 2014; HOWARD, 2012). A dinâmica das infecções hospitalares causadas por eles tornou-se um desafio para as equipes médicas, devido à facilidade que estas bactérias apresentam em adquirir mecanismos de resistência a diversos agentes antimicrobianos, resultando em

dificuldades na escolha da terapia medicamentosa eficaz e contribuindo para sua disseminação e persistência no cenário hospitalar.

No Brasil, o surgimento e disseminação de bactérias produtoras de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL) têm sido retratados como um grande problema de saúde pública, especialmente no que diz respeito aos patógenos associados a IRAS (CARVALHO *et al.*, 2013). Nos hospitais da cidade do Recife, em Pernambuco, destacam-se os isolados de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* que tem demonstrado elevados níveis de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos e a outros antimicrobianos de escolha terapêutica, dificultando o controle das infecções. Esses dados apontam para necessidade do conhecimento dos mecanismos de resistência presentes nesses isolados a fim de contribuir com as políticas de saúde pública quanto à elaboração de estratégias de controle de surtos epidêmicos. Sendo assim, o diagnóstico rápido e preciso dos genes de resistência no tratamento de infecções causadas por essas bactérias é extremamente importante na prevenção da propagação dessas infecções, auxiliando a terapêutica adequada nesses serviços (CARVALHO *et al.*, 2013).

### 2.3 Características gerais de *Acinetobacter baumannii*

*Acinetobacter baumannii* (ordem Pseudomonadales, família Moraxellaceae) é um cocobacilo Gram-negativo, estritamente aeróbico, pleomórfico, que não apresenta motilidade (Figura 1). O primeiro micro-organismo do gênero foi descrito em 1908 como *Diplococcus mucosus*, o qual foi posteriormente isolado do solo em 1911 por Beijerinck, sendo descrito como *Micrococcus calcoaceticus*. Anos mais tarde, foi proposto por Brisou e Prevot o gênero *Acinetobacter* que deriva do grego “*Akinetos*” (não mótil) e, em 1968, foi oficialmente aceito através dos estudos de Baumann (HOWARD *et al.*, 2012; BAUMANN *et al.*, 1968; BRISOU; PREVOT, 1954; BEIJERINCK, 1911).

**Figura 1:** *Acinetobacter baumannii* em meio Brain Heart Infusion (BHI) Agar.



Fonte: A autora 2017

Atualmente esse gênero compreende 34 espécies diferentes (Tabela 1) que são de difícil distinção devido a semelhança entre elas, sendo necessário, na maioria das vezes, a utilização de métodos precisos como de Biologia Molecular ou Espectrofotometria de Massas, que não são amplamente utilizados na rotina em laboratório clínico. *A. baumannii* é a espécie clinicamente mais relevante, e faz parte do complexo *A. baumannii calcoaceticus*, que agrupa quatro diferentes espécies: *A. pittii*, *A. nosocomialis*, *A. calcoaceticus* e *A. baumannii* (KIM *et al.*, 2014; MARTINS; BARTH, 2013).

**Tabela 1.** Espécies de *Acinetobacter* spp. descritas na literatura

Espécies de <i>Acinetobacter</i> spp			
Comuns em infecções humanas		Incomuns em infecções humanas	
<i>A. baumannii</i>	<i>A. baylyi</i>	<i>A. haemolyticus</i>	<i>A. qingfengensis</i>
<i>A. calcoaceticus</i>	<i>A. beijerinckii</i>	<i>A. harbinensis</i>	<i>A. radioresistens</i>
<i>A. pittii</i>	<i>A. bereziniae</i>	<i>A. indicus</i>	<i>A. rudis</i>
<i>A. nosocomialis</i>	<i>A. boissieri</i>	<i>A. johnsonii</i>	<i>A. schindleri</i>
	<i>A. bouvetii</i>	<i>A. junii</i>	<i>A. soli</i>
	<i>A. brisouii</i>	<i>A. kookii</i>	<i>A. tandoii</i>
	<i>A. gernerii</i>	<i>A. lwoffii</i>	<i>A. tjernbergiae</i>
	<i>A. guillouiae</i>	<i>A. nectaris</i>	<i>A. townneri</i>
	<i>A. grimontii</i>	<i>A. parvus</i>	<i>A. ursingii</i>
	<i>A. gyllenbergii</i>	<i>A. puyangensis</i>	<i>A. venetianus</i>

Fonte: A autora 2017

O gênero *Acinetobacter* spp. pode adaptar-se a diferentes ambientes, possuindo uma alta versatilidade nutricional, sendo encontrada em solo, água, vegetais, animais, pele e trato gastrointestinais de seres humanos saudáveis. *A. baumannii*, espécie mais relevante clinicamente, raramente tem sido encontrada em fontes ambientais, mas possui uma enorme capacidade de se manter viável por longos períodos em superfícies secas, sendo frequentemente isoladas no ambiente hospitalar em vários objetos abióticos como bancadas, leitos, equipamentos de raios- x, ventiladores, sistemas de circulação de ar entre outros (MARTINS; BARTH, 2013; HOWARD, *et al.*, 2012).

Nas últimas décadas, *A. baumannii* tem sido considerado um dos patógenos de maior relevância clínica, fato associado aos múltiplos mecanismos de resistência a antimicrobianos que possui. Considerado oportunista, acomete pacientes imunodeprimidos ou submetidos a procedimentos invasivos, transplantados e principalmente em Unidades de Tratamento Intensivo (UTI), atingindo uma ampla gama de infecções nosocomiais incluindo pneumonia associada à ventilação mecânica, meningite, bacteremias, infecções cutâneas, do trato urinário, entre outras (PATIÑO; CONTRERAS; LIMÓN, 2017; MARTINS; BARTH, 2013).

O aumento da multirresistência a antimicrobianos por esse micro-organismo oportunista obrigatório tornou-se alarmante, dificultando o tratamento eficaz e tornando fundamental o

entendimento dos mecanismos de resistência presentes nesses micro-organismos (PATIÑO; CONTRERAS; LIMÓN, 2017). Essa bactéria possui um amplo espectro de mecanismos intrínsecos e uma enorme capacidade de adquirir mecanismos de resistência a antimicrobianos, o que as tornam persistentes em ambiente hospitalares facilitando a emergência de cepas MDR, Extensivamente-Droga-Resistentes (XDR) e Pan-Droga-Resistentes (PDR), ou seja, cepas resistentes a três ou quatro classes de drogas, resistentes a cinco ou seis classes de antimicrobianos ou o tipo especialmente alarmante de resistência, não havendo antimicrobianos com atividade contra essas cepas, respectivamente (CUENTAS, 2016; LEMOS *et al.*, 2013; CONNELL; ACTIS; PACHÓN, 2012).

Destaca-se a capacidade notável que *A. baumannii* possui, não só de aquisição horizontal de traços genéticos, como também reorganização de genes pré-existentes. Essa espécie apresenta um genoma cromossomal relativamente pequeno e um genoma extra cromossomal grande, que hospeda numerosos genes de resistência aos antibióticos, além de determinantes de virulência, provavelmente adquiridos pelo processo de transferência horizontal de genes. A resistência aos carbapenêmicos nesse micro-organismo, por exemplo, resulta com frequência da produção de  $\beta$ -lactamases, como também pode resultar da excessiva expressão de bombas de efluxo, que expulsam antibióticos para o meio extracelular ou de alterações nas porinas da membrana externa, que bloqueiam a entrada de antimicrobianos. A espécie também possui uma oxacilinase intrínseca de classe D, pertencente ao grupo de enzimas do tipo OXA-51 que constitui mais de 40 variantes de sequência. A natureza ubíqua de genes semelhantes a OXA-51 em *A. baumannii*, possibilitou que esse gene se tornasse um importante marcador genético na identificação dessa bactéria ao nível da espécie (CUENTAS, 2016; LEMOS *et al.*, 2013; CONNELL; ACTIS; PANCHÓN, 2012). Os principais mecanismos de resistência identificados para diferentes classes de antibióticos estão resumidos na Tabela 2.

**Tabela 2.** Principais mecanismos de resistência a antimicrobianos encontrados em *Acinetobacter baumannii*

Classe da droga	Mecanismo de resistência	Exemplos
β- lactâmicos	Inativação de enzimas	β-lactamases (AmpC, TEM, VEB, PER, CTX-M, SHV) Carbapenemases (OXA-23, -40, -51, -58-143-like, VIM, IMP, NDM-1, -2)
	Diminuição da expressão da proteína da membrana externa	CarO, proteína 33–36 kDa, proteína OprD-like
	Alteração da expressão da proteína de ligação à penicilina	PBP2
Fluoroquinolonas	Bombas de efluxo	AdeABC
	Modificação do alvo	Mutações em gyrA e parC
Aminoglicosídeos	Bombas de efluxo	AdeABC, AdeM
	Enzimas modificadoras de aminoglicosídeos	AAC, ANT, APH
	Bombas de efluxo	AdeABC, AdeM
Tetraciclinas	Metilação ribossomal	ArmA
	Bombas de efluxo	AdeABC, TetA, TetB
Gliciliclinas	Proteção ribossômica	TetM
Polimixina (colistina)	Bombas de efluxo	AdeABC
		As mutações no sistema de dois componentes PmrA / B (modificação LPS), Mutações nos genes da biossíntese de LPS

Fonte: Adaptado de Mc Connell, Actis e Pachón (2012).

Apesar do grande papel de *A. baumannii* nas infecções nosocomiais, seus vários fatores de virulência específicos ainda não estão totalmente elucidados (Tabela 3). Dentre eles, destacam-se os sistemas de aquisição de ferro, mediados por sideróforos, proteína OmpA, e a formação de biofilme, que contribuem significativamente, para o aumento da sua patogenicidade (LEMOS *et al.*, 2013; HOWARD *et al.*, 2012).

O fator de virulência mais bem caracterizado é a proteína OmpA. Sua ação contribui na adesão e na invasão de células epiteliais, permitindo que esse micro-organismo cresça em soro humano, evitando sua morte mediada pelo sistema complemento, bem como uma maior formação de biofilme (MCCONNELL; ACTIS; PACHÓN, 2012).

**Tabela 3.** Fatores de virulência de *Acinetobacter baumannii*

<b>Fator de virulência (gene)</b>	<b>Papel proposto na patogênese</b>
OmpA (ompA)	Indução de apoptose em células hospedeiras, aderência e invasão de células epiteliais, formação de biofilmes, motilidade superficial, resistência ao soro
Lipopolissacarídeo (lpsB)	Evasão da resposta imune do hospedeiro
Polissacarídeo capsular (ptk e epsA)	Evasão da resposta imune do hospedeiro, crescimento no soro
Fosfolipase D (A1S_2989)	Resistência ao soro, disseminação bacteriana, sobrevivência bacteriana in vivo
Proteína 7/8 de ligação à penicilina (pbpG)	Biossíntese de peptidoglicano, estabilidade celular, crescimento no soro
Vesículas de membrana externa	Entrega de fatores de virulência ao citoplasma de células hospedeiras, transferência de material genético entre células bacterianas
Sistema de aquisição de ferro mediado por acinetobactina	Fornecer ferro necessário para persistir no host, causa apoptose celular

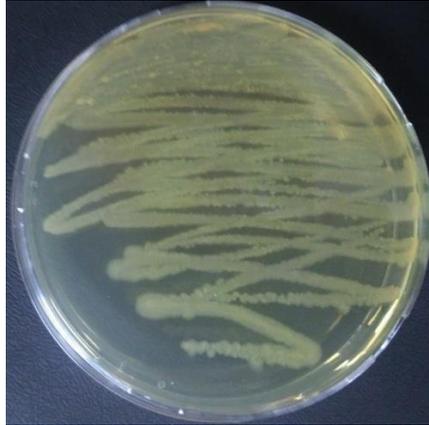
Fonte: Adaptado de Mc Connell, Actis e Pachón 2013.

De um modo geral, a aderência de *A. baumannii* a superfícies bióticas e abióticas resulta do desenvolvimento de biofilmes, permitindo que ela cresça persistentemente em condições e ambientes desfavoráveis. A formação de biofilme é bastante variável entre os isolados clínicos, sem apresentar correlação entre a natureza da superfície que está sendo aderida. Adicionalmente, envolve uma série de fatores bacterianos e sinais químicos que facilita sua formação (LEMOS *et al.*, 2013; MCCONNELL; ACTIS; PACHÓN, 2012; HOWARD *et al.*, 2012).

#### 2.4 Características gerais de *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* (família Pseudomonadaceae) é um bacilo Gram-negativo, aeróbio, não fermentador de glicose e móvel (Figura 2). Apresenta uma temperatura ótima de crescimento entre 37°C e 42°C, e em alguns meios de cultura produz alguns pigmentos como a pioverdina, piocinina, piorrubina e piomelanina, que associados resultam em uma coloração esverdeada, característica comum a cepas desta espécie (LAILA; SANTOS, 2016).

**Figura 2:** *Pseudomonas aeruginosa* em meio Brain Heart Infusion (BHI) Agar



Fonte: A autora 2017

O primeiro micro-organismo do gênero foi descrito por Migulo em 1894, e durante vários anos o gênero compreendeu inúmeras espécies, que não foram bem caracterizadas. Apenas em 1965 Stanier e colaboradores, estabeleceram a base taxonômica para sua identificação. Atualmente, compreende 144 espécies reconhecidas e é considerado o gênero mais complexo e mais representativo. Dentre as 144 espécies, as principais causadoras de doenças em seres humanos são: *P.aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. cepacia*, *P.stutzeri*, *P.maltophilia* e *P. putrefaciens*. A que merece maior destaque, por ser mais frequentemente encontrada em infecções hospitalares e associada a complicações é *P. aeruginosa* (GOMILA *et al.*, 2015; NADEEM *et al.*, 2009), que pode ser encontrada em vários ambientes, como solo, água, plantas e seres humanos. Essa bactéria comporta-se como oportunista, acometendo pacientes imunocomprometidos, tendo como principais sítios de infecção o trato respiratório, urinário e está relacionada a uma grande variedade de infecções sistêmicas, acometendo muitos pacientes com fibrose cística, por exemplo (LAILA; SANTOS, 2016; OCHOA *et al.*, 2013).

Este micro-organismo, considerado uma das principais causas de infecção nosocomial, está associado com uma maior taxa de mortalidade sendo incluído na lista de patógenos representando ameaça à saúde pública mundial, devido a sua alta prevalência derivada da ineficácia de agentes antimicrobianos existentes. A elevada resistência está associada, a baixa permeabilidade de sua parede celular e a sua enorme capacidade de adquirir e expressar múltiplos mecanismos de resistência, ver Tabela 4 (MARTIS; LEROY; BLANC, 2014; MULCAHY; ISABELLA; LEWIS, 2013).

**Tabela 4.** Principais mecanismos de resistência de *Pseudomonas aeruginosa*

Classe da droga	Mecanismo de resistência
$\beta$ - lactâmicos	Depressão de AmpC Desregulamentação da Oxacilinase de classe D; Carboxipenicilina hidrolisando b-lactamases enzima específica de <i>P. aeruginosa</i> (PSE); $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBLs). Diferentes enzimas (SHV, TEM, VEB, GES, PER) Metallo- $\beta$ lactamases (IMP, VIM, SPM, GIM) Diminuição da expressão da membrana externa canal de porina (OprD) Bombas de efluxo
Aminoglicosídeo	Enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AME) Aminoglicosídeo acetiltransferases (AAC) Adreniltransferases de aminoglicosídeo (ANT) Metilação de <i>16S rRNA</i> (RmtA) Impermeabilidade Bombas de efluxo
Fluoroquinolonas	DNA gyrase Mutações em <i>gyrA</i> / <i>gyrB</i> Bombas de efluxo

Fonte: Adaptado de Martis, Leroy e Blanc (2014).

Devido ao seu genoma relativamente grande, esse patógeno apresenta alta plasticidade genômica, codificando uma série de genes de resistência, incluindo bomba de efluxo, enzimas, entre outros, tornando assim a terapia desafiadora. *P. aeruginosa* é naturalmente resistente a penicilinas, cefalosporinas de 1ª e 2ª geração, macrólidos, ciclinas, glicopeptídeos e clotrimexazol (LAILA; SANTOS, 2016; NATAHWANI *et al.*, 2014; PEDROSA *et al.*, 2014).

O tratamento e erradicação das infecções persistentes causadas por essa espécie são dificultados principalmente pela sua resistência adaptativa que é consequência da soma de diversos fatores de virulência. Estes fatores (Tabela 5) neutralizam as defesas do hospedeiro causando, muitas vezes, danos diretos aos seus tecidos e aumentando, assim, a competitividade da bactéria (GELLATLY; HANCOCK, 2013).

**Tabela 5.** Principais fatores de virulência em *P. aeruginosa*

<b>Fator de virulência</b>	<b>Papel proposto na patogênese</b>	<b>Referência (s)</b>
Flagelos, pili 4 e fímbrias	Funcionam como adesinas e são responsáveis tanto pela fixação, como também pela motilidade	Miao <i>et al.</i> , 2007, Mikkelsen <i>et al.</i> , 2011 e Gellatly; Hancock, 2013
Sistema de secreção 3 (T3SS) ExoY, ExoS, ExoT e ExoU	Atua antagonizando a cicatrização e causando lesão celular	Hauser <i>et al.</i> , 2009 e Gellatly; Hancock, 2013
Quorum sense e Formação de biofilme	São regulados por esse sistema a sobrevivência celular, comunicação, formação de biofilmes e a virulência, diminuindo a penetração de substâncias químicas tóxicas.	Hall-Stoodley; Stoodley, 2009, Lieleg <i>et al.</i> , 2011 e Gellatly; Hancock, 2013
Proteases (LasA, LasB)	Degradar imunoglobulinas e fibrina e interromper junções epiteliais apertadas e danos nos tecidos	Matsumoto, 2004, Kipnis <i>et al.</i> , 2006 e Gellatly; Hancock, 2013
Lipopolissacarídeo (lipídeo A e O-polissacarídeo)	Atuam na resposta inflamatória e interações mediante com antibióticos	King <i>et al.</i> 2009, Lam <i>et al.</i> 2011 e Gellatly; Hancock, 2013
Pigmentos (piocianina)	Induzir a apoptose em neutrófilos, bem como inibir a fagocitose por macrófagos	Lau <i>et al.</i> , 2004, Bianchi <i>et al.</i> , 2008 e Gellatly; Hancock, 2013
Sistema de aquisição de ferro mediado	Fornecer ferro necessário para persistir e apoptose celular	Gaddy <i>et al.</i> 2012 e Gellatly & Hancock, 2013

Fonte: A autora 2017

Um fator de virulência que merece destaque é a capacidade de formação de biofilme, que contribui significativamente para sua persistência. O biofilme se torna um importante problema médico, pois confere a *P. aeruginosa*, a capacidade de se aderir a equipamentos médicos, como cateteres e tubos endotraqueais em poucas horas, podendo crescer também em tecidos hospedeiros, como superfícies epiteliais durante as infecções (GELLATLY; HANCOCK, 2013). Infecções fatais por *P. aeruginosa* tem sido relacionada a formação de biofilmes, onde por meio da colonização crônica, ocorre a conversão do fenótipo não mucóide para o mucóide. Este micro-organismo é capaz de secretar uma grande quantidade de exopolissacarídeo altamente viscoso, composto

particularmente por alginato, ácidos nucleicos e proteínas; constituintes principais do biofilme, contribuindo assim para o seu aumento e perpetuação (PINTO, 2011; LAILA; SANTOS, 2016).

## 2.5 Características gerais dos $\beta$ -lactâmicos

O primeiro antibiótico  $\beta$ -lactâmico foi descoberto acidentalmente por Alexander Fleming, em 1928, como uma substância secretada pelo fungo *Penicillium notatum*, sendo então denominada como "penicilina" (FLEMING, 1929). Todos os fármacos pertencentes a essa classe apresentam em sua estrutura molecular um anel  $\beta$ -lactâmico, sendo este essencial para o seu mecanismo de ação na parede celular bacteriana e alvo de atuação de  $\beta$ -lactamases. A estrutura química destes fármacos vem sendo frequentemente manipulada para se obter maior atividade e mais aplicabilidades terapêuticas (ESSACK, 2001; GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

A partir da descoberta da penicilina, outros  $\beta$ -lactâmicos foram descritos e são atualmente divididos em quatro principais grupos em função da estrutura química apresentada: penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos (Tabela 6). Estruturas ligadas diretamente a esse núcleo comum os diferenciam, além dos demais radicais presentes nas cadeias laterais o que caracteriza cada representante desses grupos (NORDMANN; DORTET; POIREL, 2012).

Todos os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos têm um elemento estrutural farmacofórico em comum, o anel azetidínico de quatro membros ou anel  $\beta$ -lactâmico. Este anel central é fundido a outros membros, como no caso das penicilinas que são formadas por um anel tiazolidínico ou nas cefalosporinas, um anel difidrotiazínico, qualquer alteração estrutural pode levar à perda da atividade antibacteriana da molécula. As modificações estruturais possíveis ficam restritas às cadeias laterais ao se adicionar diferentes grupos químicos a esse núcleo resultando em várias famílias de penicilinas com novas propriedades físico-químicas e farmacológicas (ESSACK, 2001; GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

**Tabela 6.** Estrutura dos principais grupos dos  $\beta$ -lactâmicos

Classe	Estrutura	Nota
<b>Penicilinas</b>		<p>Consistem de um anel de tiazolidina fundido com o anel de <math>\beta</math>-lactâmico em que as diferentes cadeias laterais de grupos acilas estão ligadas a radicais.</p> <p>(Ex. Ampicilina, amoxicilina, piperacilina).</p>
<b>Cefalosporinas</b>		<p>Possui um anel de di-hidrotiazina fundido ao anel <math>\beta</math>- lactâmico.</p> <p>(Ex. Cefalotina, cefuroxima, cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefotetam e cefepima).</p>
<b>Monobactâmicos</b>		<p>Molécula de <math>\beta</math>-lactâmico monocíclica, inicialmente isolada a partir de <i>Chromobacterium violaceum</i>.</p> <p>(Ex. Aztreonam)</p>
<b>Carbapenêmicos</b>		<p>Assemelha-se às penicilinas, com exceção do anel de cinco elementos em que o átomo de enxofre foi substituído por um átomo de carbono e tem uma ligação dupla entre o carbono 2 e 3.</p> <p>(Ex. Imipenem, meropenem e ertapenem).</p>

Fonte: Adaptado de Essack (2001).

A partir da base estrutural ácido 6-aminopenicilinas, inicialmente produzidas por fermentação, foi possível produzir várias compostos sintéticos e semi-sintéticos. As penicilinas G e V, ativas contra cocos Gram-positivos, têm sua ação inativada por hidrólise da ligação  $\beta$ -lactâmica e da cadeia lateral de acilamino do antibiótico através das enzimas penicilinases e acilases, respectivamente, produzidas por essas bactérias. Penicilinas como ampicilina e amoxicilina compõe um grupo de drogas com ação melhorada sobre bactérias Gram-negativas (FERNANDES; AMADOR; PRUDÊNCIO,2013).

As cefalosporinas são agentes antimicrobianos semi-sintéticos derivados do fungo *Cephalosporium acremonium*. Este grupo possui um núcleo básico, o ácido 7-amino-cefalosporânico

que é composto por um anel  $\beta$ -lactâmico ligado a um anel diidrotiazínico. São distribuídos em quatro gerações, de acordo com algumas características microbiológicas e estruturais. A primeira geração destes fármacos apresentam menor atividade em comparação as penicilinas, porém possuem boa atividade sobre alguns cocos Gram-positivos, como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus pneumoniae*. Já as cefalosporinas de segunda geração, possuem maior espectro de ação frente à bactérias Gram-negativas, entretanto, são menos efetivas que as de terceira geração. A terceira geração inclui as de amplo espectro de ação, como cefotaxima, ceftazidima e ceftriaxona. Apesar de normalmente serem menos ativas do que aquelas de primeira geração contra cocos Gram-positivos, elas exibem atividade muito maior contra as enterobactérias, incluindo linhagens produtoras de  $\beta$ -lactamases clássicas. As cefalosporinas de quarta geração, como cefepima, possuem um maior espectro de ação quando comparadas às de terceira geração (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010; SOUSA, 2006).

Os carbapenêmicos, como imipenem e mais recentemente doripenem, foram apontados como alternativas terapêuticas no combate as infecções nosocomiais graves, provocadas, principalmente por bactérias Gram-negativas multirresistentes, como aquelas produtoras de ESBL ( $\beta$ -lactamase de espectro estendido). Estes compostos exibem também um espectro de ação mais amplo em relação à todos os outros antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, incluindo cocos Gram-negativos e Gram-positivos, bacilos Gram-negativos e Gram-positivos e algumas cepas multirresistentes e anaeróbias (NORDMANN; DORTET; POIREL, 2012).

Já os monobactâmicos, como o aztreonam que é o único representante dessa classe, apresentam atividade restrita a bactérias Gram-negativas, como *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria meningitidis*, *Yersinia enterocolitica*, entre outras. Esse grupo de  $\beta$ -lactâmicos apresenta considerável estabilidade à degradação pela maioria das  $\beta$ -lactamases (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Dentre os  $\beta$ -lactâmicos, inclui-se também o grupo dos inibidores de  $\beta$ -lactamases, como ácido clavulânico, sulbactam ou tazobactam, que atuam como coadjuvantes dos antibióticos, potencializando o espectro das penicilinas no combate a micro-organismos produtores de  $\beta$ -lactamases. Tais fármacos possuem similar estrutura ao da penicilina, com variação apenas na cadeia lateral. Funcionam como substrato para as  $\beta$ -lactamases e dessa forma deixam disponível o antibiótico para que este exerça sua atividade farmacológica. Associações frequentes são piperacilina com tazobactam aplicado no combate a infecções do trato respiratório inferior e vias urinárias e amoxicilina com ácido clavulânico em infecções do trato respiratório (INFARMED, 2011).

Os  $\beta$ -lactâmicos são os antimicrobianos mais utilizados no combate às infecções bacterianas, correspondendo a muitas das prescrições de antibióticos utilizados na prática médica no mundo. São

prontamente adotados devido a sua eficácia e segurança clínica e, especialmente, a sua alta toxicidade seletiva. Sua atividade, pode ser estendida ou restaurada por meio de manipulações em sua estrutura química e, portanto nenhuma outra classe de antimicrobiano fornece igual maleabilidade química e versatilidade (FERNANDES; AMADOR; PRUDÊNCIO, 2013).

O uso extensivo de antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos cada vez mais frequente tem ocasionado pressão seletiva com conseqüente surgimento de bactérias multirresistentes. Tal fenômeno possui impacto direto na escolha da terapia antimicrobiana mais adequada, contribuindo para o insucesso terapêutico e, por vezes, a morte do paciente acometido por este tipo de infecção.

## 2.6 Características gerais das $\beta$ -lactamases

As  $\beta$ -lactamases são enzimas que hidrolisam o anel  $\beta$ -lactâmico e são classificadas conforme a estrutura e as características bioquímicas e funcionais. A classificação baseada na estrutura molecular foi inicialmente proposta por Ambler (1980), dividindo as  $\beta$ -lactamases em quatro diferentes grupos (A, B, C e D), considerando a similaridade entre as sequências de aminoácidos. A segunda importante classificação foi postulada por Bush, Jacoby e Medeiros (1995) dividindo-as em quatro grupos (1, 2, 3 e 4) levando em conta, além de seu aspecto funcional, sua estrutura, seus substratos e sensibilidade aos inibidores de  $\beta$ -lactamases, ver Tabela 7 (BUSH; FISHER, 2011; BUSH, *et al.*, 1995).

A resistência aos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos é resultante da ação de  $\beta$ -lactamases de Espectro Estendido (ESBL), um grupo diversificado de enzimas codificadas por genes que concede resistência as cefalosporinas de terceira e quarta geração e monobactâmicos. Porém a maioria é bloqueada por inibidores de  $\beta$ -lactamases. Além dessas enzimas, vem sendo descritas as carbapenemases, que são capazes de hidrolisar todos os  $\beta$ -lactâmicos. A prevalência e o aumento de bactérias resistentes devem-se, em grande parte, à produção dessas enzimas que são derivadas de mutações pontuais (SEYEDJAVADI; GOUDARZI; SABZEHALI, 2016; ELRAMALLI; ALMSHAWT; AHMED, 2017).

**Tabela 7.** Classificação molecular e agrupamento funcional de  $\beta$ -lactamases.

Classificação		Enzimas representantes	Mecanismos de ação
Classe	Grupo (Bush-Jacob)		
C	1	AmpC, CMY-2, FOX-1, MIR-1, P99	Hidrolisa cefalosporinas, cefamicinas e penicilinas.
C	1e	GC1 e CM Y-37	Hidrolise penicilinas e até a 3ª geração de cefalosporinas.
A	2a	PC1	Hidrolisa melhor penicilinas do que cefalosporinas.
A	2b	SHV-1, TEM-1, TEM-2	Hidrólise similar para penicilinas e cefalosporinas
A	2be	TEM-3, SHV-5, TEM-10, TEM-26, SHV-2, CTX-M15, PER-1, VEB-1	Hidrólise ampliada para todas as cefalosporinas e aztreonam
A	2br	TEM-30, TEM-76, TEM-103, SHV-10, SHV-26	Hidrólise eficiente de penicilinas e primeiras cefalosporinas.
A	2ber	TEM-50, TEM-68, TEM-89	Hidrólise das penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos.
A	2c, 2ce	PSE-1, CARB-3	Hidrólise eficiente da carbenicilina.
D	2d	OXA-1, OXA-10	Hidrolise ampliada para Cloxacilina ou oxacilina
D	2de	OXA-11, OXA-15	Hidrolise ampliada para penicilinas e todas as cefalosporinas.
D	2df	OXA-23, OXA-48	Hidrolise ampliada para penicilinas e carbapenêmicos.
A	2e	CepA	Hidrolisa cefalosporinas, mas não monobactâmicos.
A	2f	MI-1, KPC-2, KPC-3, SME-1, GES-2	Hidrolisa todos $\beta$ -lactâmicos, inclusive carbapenêmicos.
B	3a	IMP-1, L1, VIM-1, NDM-1	Hidrolisa todos $\beta$ -lactâmicos, exceto monobactâmicos.
B	3b	CphA, Sfh-1	Hidrolisa todos $\beta$ -lactâmicos, exceto monobactâmicos.

Fonte: Adaptado de Bush e Jacoby (2010); Buch e Fisher (2011).

### 2.6.1 Ampicilinases C

As ampicilinases C, também conhecidas como cefalosporinases, são enzimas que proporcionam resistência às penicilinas, inibidores de  $\beta$ -lactamases, cefalosporinas de primeira, segunda e terceira geração, entretanto sensíveis à cefepima (4ª geração). Possuem baixa afinidade aos carbapenêmicos, porém quando a enzima é produzida em grande quantidade, fecha as porinas das bactérias, tornando possível a hidrólise do antimicrobiano e proporcionando a resistência aos carbapenêmicos. Quando presente, o gene *ampC* nos cromossomos, as bactérias regulam molecularmente a sua expressão gênica, sintetizando quando necessário essa  $\beta$ -lactamase. Contudo,

essas enzimas são adquiridas por algumas bactérias por meio de plasmídios, podendo estar presente também nos genes cromossomais, como em algumas bactérias Gram-negativas, a exemplo de *P. aeruginosa* e *A. baumannii*, além de representantes da família Enterobacteriaceae (SUAREZ *et al.*, 2006; GHAFOURIAN *et al.*, 2015).

### 2.6.2 $\beta$ -lactamases de Espectro Estendido

$\beta$ -lactamases de Espectro Estendido (ESLB) são enzimas que possuem a capacidade de hidrolisar cefalosporinas de terceira e quarta gerações e aztreonam e, podem ser inativadas por inibidores específicos, como o clavulanato, sulbactam e tazobactam. Seus representantes pertencem ao grupo 2B (*TEM*, *SHV* e *CTX-M*) e ao grupo 2D (*OXA*), de acordo com a classificação de Bush-Jacoby-Medeiros. A primeira beta-lactamase codificada por elemento genético móvel foi identificada em um isolado de *Escherichia coli* (*TEM-1*) e sua localização em plasmídeos e transposons possibilitou sua disseminação por transferência horizontal em outras espécies de Enterobacteriaceae como também em *P. aeruginosa*, *Haemophilus influenza* e *Neisseria gonorrhoeae*. Na América Latina, a primeira descrição de ESBL foi descrita no Chile, sendo reportada a presença de *SHV-5* em *K. pneumoniae*, enquanto que no Brasil, sua produção em Enterobacteriaceae e outras espécies é alarmante, uma vez que variantes do tipo *TEM*, *SHV*, *CTX-M*, *OXA*, *BES*, *GES* e *VEB* tem sido descritas. Um dos tipos de ESBL que merece destaque por ser considerado o mais prevalente entre as beta-lactamases é o *SHV-1* que possuem, atualmente, mais de 100 variantes no mundo e são encontrados em ampla gama de enterobactérias, *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp (GHAFOURIAN *et al.*, 2015; SILVA; LINCOPAN, 2012).

### 2.6.3 Metallo- $\beta$ -lactamases

Considerado o grupo mais importante clinicamente, as metallo- $\beta$ -lactamases, pertencem ao grupo 3 da classificação de Bush e a classe B de Ambler. Estas enzimas são capazes, de hidrolisar todos os  $\beta$ -lactâmicos, com exceção do monobactâmico, aztreonam. O primeiro MLB foi detectado em 1988, no Japão em um isolado de *P. aeruginosa*. Nos últimos anos, tem sido detectado com frequência em espécies da família Enterobacteriaceae e no gênero *Acinetobacter*. Esta disseminação resulta da prescrição dos carbapenêmicos utilizados como último recurso nas infecções por microorganismos Gram-negativos multirresistentes, além da natureza móvel que apresentam e as dificuldades na sua detecção e indisponibilidade clínica de inibidores. Consequentemente, estes estão emergindo como um importante problema de saúde pública em todo mundo. Baseado em características bioquímicas, este grupo de enzimas foi subdividido em dois grupos. O grupo 3 inclui

as principais famílias, codificadas por plasmídeos, como *IMP* e *VIM*, bem como o *CAU-1*, *GOB-1* e *FEZ-1*, pertencentes a subclasse 3 b (MALTEZOU, 2009; BUSH; JACOBY, 2011).

#### 2.6.4 Serino- $\beta$ -lactamases

Pertencentes a classe molecular A e subgrupo 2f, as serino- $\beta$ -lactamases são enzimas que apresentam um resíduo de serina no centro ativo de suas estruturas e possuem atividades frente a penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e aztreonam. Suas representantes são IMI-1 e NMC-1, encontradas nos genes *GES-3*, *GES-4* e *KPC*, codificadas por plasmídeos. As que merecem destaque, no entanto, incluem as do tipo *KPC* e algumas enzimas GES, que vem sendo associadas, a grandes surtos de infecções em Gram-negativas resistentes a vários medicamentos em hospitais, com disseminação mundial. Atualmente, as famílias *KPC* e *GES* podem incluir pelo menos 10 sequências de aminoácidos únicas e 17 variantes específicos, em bactérias fermentadoras e não fermentadores (BUSH; FISHER, 2011).

Inicialmente, a *KPC* foi identificada em um isolado de *Klebsiella pneumoniae* nos Estados Unidos em 1996 e posteriormente se difundiu para outros membros da família Enterobacteriaceae. As serino- $\beta$ -lactamases possuem capacidade de hidrolisar todos os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos disponíveis na prática clínica e tem ação contra outras classes de antibióticos como aminoglicosídeos e macrolídeos. Isolados de Enterobacteriaceae, *Acinetobacter spp.* e *P. aeruginosa* produtoras de *KPC*, vem recebendo destaque mundial como multirresistentes, muitos dos quais, são tratáveis apenas por colistina/polimixinas e tigeciclina (BUSH; FISHER, 2011; BUSH; JACOBY, 2010; ROBLEDO, 2010).

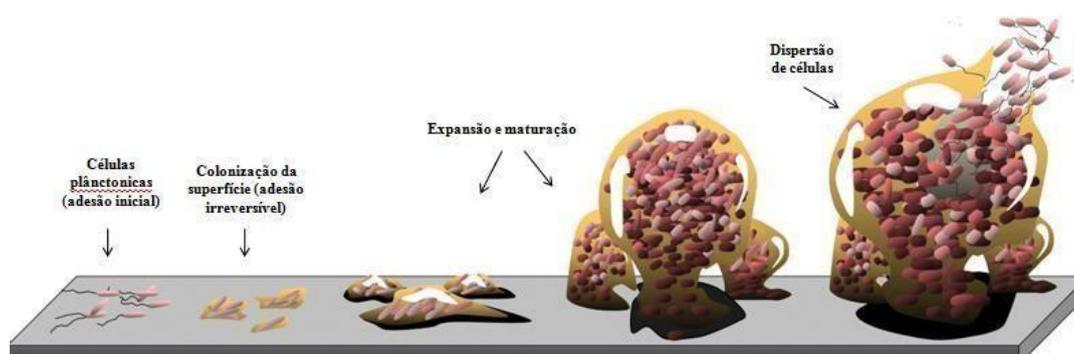
#### 2.7 Biofilme

Biofilmes são estruturas tridimensionais, multicelulares complexas com células em contato íntimo entre si, apresentando-se como comunidades, formados pelos mais diversos tipos de microorganismos, como fungos, algas, protozoários ou por uma ou mais espécies bacterianas. O biofilme organiza-se em várias camadas aderidas de modo irreversível a uma superfície biótica ou abiótica que são envolvidas numa matriz extracelular que pode ser constituída por hidratos de carbono, ácidos nucléicos, proteínas, entre outras macromoléculas. O maior componente da massa total do biofilme é a água que pode variar entre 70% a 95% e, referente à massa orgânica, 70% a 95% é representada por

exopolissacarídeo (EPS), sendo o restante constituído por substâncias poliméricas e, em menor quantidade pelo micro-organismo (LAILA, 2016; MC CONNELL; ACTIS; PACHÓN, 2012).

Os biofilmes são formados de maneira dinâmica e gradual (Figura 3), envolvendo várias etapas, dependendode fatores externos e internos como temperatura, pH, superfície de adesão, produção de EPS, presença de pili, fimbrias e flagelos, hidrofobicidade da parede celular bacteriana, além de fatores genéticos, de virulência e resistência. A primeira fase da formação é a adesão bacteriana reversível que pode ocorrer em superfícies bióticas, mediadas por interações moleculares ou em superfícies abióticas, por meio de interações físico-químicas. A segunda etapa da adesão bacteriana consiste na adesão irreversível, onde ocorre a consolidação do processo de adesão por meio da produção de EPS. Após o estabelecimento e amadurecimento da matriz protetora na fase irreversível, o ciclo é finalizado com a ruptura do biofilme e a liberação das células bacterianas (TRENTIN; GIORDANI; MACEDO, 2013; MONROE, 2007).

**Figura 3.** Etapas da adesão e formação de biofilme bacteriano



Fonte: Adaptado de Monroe (2007).

O biofilme se torna uma condição vantajosa ao micro-organismo, pois oferece proteção, facilita seu crescimento, fornece nutrientes e proporciona aumento de sobrevivência em ambientes *hostis* e maior capacidade de suportar variações de pH. Adicionalmente, fornece proteção contra a ação das células do sistema imune, depreciação de nutrientes e altas concentrações de antimicrobianos. Tais propriedades tornam o biofilme um importante fator de virulência, pois facilita a adesão bacteriana a materiais plásticos como cateteres e tubos de ventilação mecânica, favorecendo a colonização e infecção dos pacientes (LAILA, 2016).

A utilização de dispositivos implantáveis, como catéteres venosos centrais, endopróteses coronarianas, dispositivos de assistência ventricular, implantes de estimulação neurológica e próteses articulares, entre outros, é indispensável em quase todas as áreas da medicina, principalmente em UTIs. Independentemente da sofisticação do implante, todos esses dispositivos, estão suscetíveis ao risco de colonização microbiana e a formação de biofilmes está frequentemente associada a infecções

que utilizam estes dispositivos. A dificuldade de tratamento, devido à resistência bacteriana em infecções associadas a biofilmes, possui consequências não só financeiras como também relacionadas à qualidade de vida dos pacientes, estando associadas ao aumento da morbidade e mortalidade dos mesmos. Portanto são de fundamental importância o entendimento e o controle da formação de biofilmes. Tarefa essa complexa, devido à heterogeneidade das superfícies bacterianas, a variabilidade entre as diferentes espécies envolvidas e a dificuldade de unir as várias áreas do conhecimento científico visando a melhoria do sistema de saúde (TRENTIN; GIORDANI; MACEDO, 2013).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

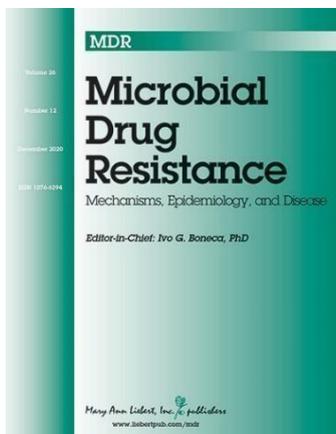
- Investigar a ocorrência de genes  $\beta$ -lactamases e o potencial de formação de biofilme em isolados de *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* obtidos de dois hospitais públicos em Recife-PE- Brasil.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Confirmar a identidade taxonômica dos isolados por meio do método MALDi-TOF-MS;
- Caracterizar os isolados de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* quanto ao perfil de resistência/suscetibilidade a diferentes classes de antimicrobianos;
- Detectar e comparar a frequência genotípica dos genes *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>* e *bla<sub>SHV</sub>* nos isolados investigados;
- Analisar o potencial de formação de biofilme nesses isolados.

#### 4. ARTIGO - Ocorrência de *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*, resistentes a drogas e formadores de biofilme intra e interhospitalares

Artigo a ser submetido para publicação no periódico: Microbial Drug Resistance



**Fator de impacto: 2,519**

**Classificação A3 no Qualis da área Ciências Biológicas II**

## **Ocorrência de *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*, resistentes a drogas e formadores de biofilme intra e interhospitais**

Ana Vitoria Araújo Lima<sup>1</sup>, Sivoneide Maria da Silva<sup>1</sup>, José Adelson Alves do Nascimento Júnior<sup>1</sup>, Maria Tereza dos Santos Correia<sup>1</sup>, Ana Carolina Luz<sup>2</sup>, Tereza Cristina Leal-Balbino<sup>2</sup>, Márcia Vanusa da Silva<sup>1</sup>, Tiago Henrique Napoleão<sup>1</sup>, Maria Betânia Melo de Oliveira<sup>1</sup>, Patrícia Maria Guedes Paiva<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*Departamento de Bioquímica - Centro de Biociências/Universidade Federal de Pernambuco*

<sup>2</sup>*Departamento de Microbiologia – Instituto de Pesquisa Aggeu Magalhães – FIOCRUZ*

*\*Autor correspondente: Maria Betânia Melo de Oliveira*

*Departamento de Bioquímica/UFPE. Av. Moraes Rego s/n, CEP: 50670-420, Recife, Pernambuco, Brasil*

*mbetaniem2008@gmail.com*

**Abstract**

*Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* são as bactérias Gram-negativas mais relevantes relacionadas com infecções associadas aos cuidados de saúde (HAI). Este estudo avaliou 35 isolados de *A. baumannii* e 65 de *P. aeruginosa* de dois hospitais públicos de Recife, Brasil, a fim de identificar o perfil de resistência e capacidade de formação de biofilmes. A identificação dos isolados foi realizada pelo método automatizado Vitek® 2 Compact e confirmada por MALDI-TOF-MS. Os isolados apresentaram perfis de resistência distintos, mas o maior índice foi detectado para o blaKPC, seguido por blaSHV, blaVIM e blaIMP. Todos os isolados foram sensíveis aos formadores de polimixina e biofilme nos meios testados, porém com intensidades diferentes. Não foi possível estabelecer correlação entre o perfil de resistência e a capacidade de formação de biofilme. Os resultados são alarmantes e demonstram a importância de programas de monitoramento para combater a disseminação desses patógenos no ambiente hospitalar.

Palavras-chave: isolados clínicos; disseminação; resistência a drogas; bactérias Gram-negativas, b-lactamases

## 1. Introdução

As infecções causadas por bactérias Gram-negativas estão entre as principais causas de morte em todo o mundo (Leylabadlo et al., 2017). O desenvolvimento de antimicrobianos terapêuticos representou um grande avanço no tratamento dessas doenças. No entanto, o uso extensivo e indiscriminado de medicamentos antimicrobianos levou ao surgimento de cepas bacterianas Multidroga- Resistente (MDR) e a consequente ineficácia de muitos antimicrobianos (Erdönmez; Rad; Aksöz, 2017). A prevalência de cepas MDR aumentou consideravelmente nos últimos anos, tornando-se um desafio clínico e implicando em altos custos para os sistemas de saúde (Oliveira et al., 2010; Bilal et al., 2017). Atualmente, um aumento exponencial no número de cepas MDR e XDR está sendo relatado para a maioria das espécies microbianas (Lahmar et al., 2016).

A resistência microbiana é descrita para todas as classes de antibióticos frequentemente usados na clínica, mas aumenta abruptamente principalmente para os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (Laxminarayan et al., 2013). Isso pode ser explicado pela ampla ocorrência de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL), um grupo diverso de enzimas codificadas por genes que fornecem resistência a cefalosporinas de terceira e quarta gerações e monobactâmicos. Dentre essas enzimas, o tipo SHV-1 é considerado o mais prevalente, incluindo mais de 100 variedades encontradas em uma ampla gama de espécies em todo o mundo (Ghafourian et al., 2015; Silva; Lincopan, 2012). Além disso, foram descritas as enzimas chamadas carbapenemases, que são capazes de hidrolisar todos os  $\beta$ -lactâmicos. O aumento de bactérias resistentes é em grande parte devido à produção dessas enzimas que são derivadas de mutações pontuais (Seyedjavadi; Goudarzi; Sabzehali, 2016; Elramalli; Almshawt; Ahmed, 2017).

O ambiente hospitalar representa um foco de disseminação de cepas resistentes e, entre os patógenos causadores de infecções nosocomiais, destacam-se as bactérias Gram-negativas *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*. As infecções causadas por esses microrganismos resultam em sérios problemas, principalmente em pacientes de UTI, devido à multirresistência aos antibióticos (Erdönmez; Rad; Aksöz, 2017; Tariq, 2014). Kang et al. (2017) investigaram a atividade antibacteriana de fármacos contra *A. baumannii* e *P. aeruginosa* MDR e XDR com o objetivo de buscar alternativas de antibioticoterapia.

A resistência a  $\beta$ -lactamas é particularmente evidente em bacilos Gram-negativos como *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, que têm um coeficiente de difusão transmembrana relativamente baixo para  $\beta$ -lactamases (Nordmann, 2010). Sua resistência aos carbapenêmicos está relacionada à expressão de  $\beta$ -lactamases, diminuição da permeabilidade da membrana externa bacteriana e / ou devido à hiperexpressão de bombas de efluxo (Nachimuthu et al., 2016). A maioria dos genes

carbapenemase, como VIM, IMP, SPM, GIM, AIM, DIM, SHV, SIM, KPC, BIC, OXA-48 e NDM foram descritos nessas duas bactérias, sendo IMP, SHV e NDM os mais frequentemente relatados (Akhi et al., 2017; McConnell; Actis; Pachón, 2013; Mathlouthi et al., 2016). A resistência antimicrobiana também pode ser facilitada pela capacidade desses patógenos de formar biofilmes. O biofilme pode atuar como uma barreira que impede a entrada do fármaco na célula bacteriana e também facilita a transferência de genes de resistência entre os indivíduos (Tanner et al., 2017).

Nesse contexto, é necessário conhecer os mecanismos de resistência presentes em isolados clínicos resistentes de *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, a fim de contribuir com a elaboração de estratégias de controle de surtos epidêmicos a serem utilizadas em saúde pública. O presente trabalho investigou a ocorrência de algumas das principais variantes do gene bla (blaSHV, blaIMP, blaVIM, blaKPC), que está ligado à produção de  $\beta$ -lactamases, em isolados clínicos de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* obtidos em hospitais públicos de Recife, Pernambuco, Brasil. Além disso, foi verificado o potencial dos isolados em formar biofilmes.

## 2. Materiais e métodos

### 2.1 Isolados Clínicos

Foram obtidos 100 isolados, sendo 35 de *A. baumannii* e 65 de *P. aeruginosa* em Recife-Pernambuco / Brasil. As amostras foram coletadas em diversos sítios de infecção de pacientes internados em diferentes setores de dois hospitais públicos, no período de abril a outubro de 2016. As amostras foram semeadas em Brain Heart Infusion (BHI) e incubadas a 37 °C por 24 h. Os isolados foram mantidos em glicerol a 25% (v / v) a -80 ° C. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Pernambuco (parecer número 1.480.085).

### 2.2. Identificação bacteriana por MALDi-TOF-MS

As colônias bacterianas foram ressuspensas em 300  $\mu$ L de água Milli-Q e 900  $\mu$ L de etanol absoluto foram adicionados. As suspensões foram centrifugadas a 15.600 g por 2 min, o sobrenadante foi removido e o pellet obtido após secagem em concentrador a vácuo por 5 min. Em seguida, foram adicionados 50  $\mu$ L de ácido fórmico a 70% (v / v) e 50  $\mu$ L de acetonitrila. A mistura foi agitada com vórtex e centrifugada a 15.600 g (2 min) e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo. A matriz foi preparada com ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (10 mg / mL) em 50% (v / v) de

acetonitrila e 0,3% (v / v) de ácido trifluoroacético e aplicada à placa MALDi juntamente com a amostra na sala temperatura de cristalização. A aquisição dos espectros de MS no modo linear positivo (tensão de aceleração 20 kV e faixa de detecção m / z 2.000–20.000) foi realizada usando o software Flex Control versão 3.0 em um espectrômetro de massa MALDi-TOF Autoflex III (Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA). Os espectros obtidos foram comparados com o banco de dados MALDi Biotyper versão 3.1.

### 2.3. Identificação do perfil de resistência / susceptibilidade e determinação das concentrações inibitórias mínimas (MIC)

A identificação do perfil de suscetibilidade e a determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM) para os antibióticos foram realizadas previamente pelos laboratórios dos hospitais utilizando o método automatizado Vitek® 2 Compact (bioMérieux). A determinação do perfil de resistência / suscetibilidade seguiu as recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2014). Foram utilizados 21 antimicrobianos na caracterização do perfil dos isolados de *A. baumannii* e *P. aeruginosa*: amicacina, aztreonam, cefazolina, cefepima, ceftazidima, ceftriaxona, cefuroxina, cefuroxina / axetil, ciprofloxacina, gentamicina, imipenem, levofloxacina, meropenem, norfloxacina, ampicilina, ampicilina/ sulbactam, cefalotina, ceftiofina, ertapenem, ticarcilina/ ácido clavulânico, polimixina B. Destes, nove (Polimixina B, Ciprofloxacina, Amicacina, Gentamicina, Meropenem, Imipenem, Cefepidima, Ceftriaxona) eram comuns às espécies Ceftriaxona. O perfil de resistência foi avaliado e comparado entre os dois hospitais investigados de acordo com a frequência de isolados MDR, XDR e N-MDR.

### 2.4. Extração total de DNA

Após incubação em caldo Brain Heart Infusion (BHI) por um período de 18 a 24 horas, a extração do DNA total foi realizada utilizando o kit PureLink® (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. A qualidade do DNA extraído foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% (p / v). Após a corrida, o gel foi observado em um transiluminador de UV e fotodocumentado. A concentração de DNA foi determinada medindo a densidade óptica em 260 e 280 nm em espectrofotômetro NanoDrop 2000, obtendo-se uma estimativa da quantidade de DNA presente na amostra e o grau de pureza.

### 2.5. Condições para detecção de genes blaKPC, blaIMP, blaVIM e blaSHV através de PCR

Os isolados foram submetidos à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para pesquisa dos genes *blaKPC*, *blaIMP*, *blaVIM* e *blaSHV*. A reação foi preparada para um volume final de 25 µL por tubo, compreendendo: 50 ng de DNA genômico, 10 pmol do primer 1 ×, 200 µM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> e enzima Taq DNA polimerase (2 U). As reações foram realizadas no termociclador (Biosystems) e após aquecimento prévio (95 °C por 5 min), foram realizados 35 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min na temperatura específica para cada primer (Tabela 1) e 1 min a 72°C. A extensão final foi de 10 min a 72 ° C para os genes *blaSHV* e *blaKPC* e 5 minutos a 68 ° C para os genes *blaIMP* e *blaVIM*.

Tabela 1. Primers utilizados para detecção de genes de β-lactamases

Primer	Gene	Sequencia (5'-3')	Temperatura de anelamento	Referência
<i>KPC</i> - For	<i>bla<sub>KPC</sub></i>	TGTCACTGTATCGCCGTC	63°C	Yigit et al. (2001)
<i>KPC</i> - Rev		CTCAGTGCTCTACAGAAAACC		
<i>SHV</i> - For	<i>bla<sub>SHV</sub></i>	GGGTTATTCTTATTTGTCGC	62°C	Rasheed et al. (2000)
<i>SHV</i> - Rev		AGCGCGAGAAGCATCCTG		
<i>IMP</i> - For	<i>bla<sub>IMP</sub></i>	GGAATAGAGTGGCTTAATTCTC	60°C	Dong et al. (2008)
<i>IMP</i> - Rev		GTGATGCGTCYCCAAYTTCACT		
<i>VIM</i> - For	<i>bla<sub>VIM</sub></i>	CAGATTGCCGATGGTGTGG	62°C	Dong et al. (2008)
<i>VIM</i> - Rev		AGGTGGGCCATTACGCCAGA		

## 2.6. Visualização de Amplicons

Os produtos de PCR (5 µL) juntamente com o corante Blue DNA (1 µL) foram carregados em gel de agarose 1% (p / v) para visualização dos amplicons referentes aos genes estudados por eletroforese. O gel foi submerso em 0,5 × Tris / Borato / tampão EDTA e submetido a uma voltagem constante de 100 V. Um marcador de 1 kb (Plus DNA Ladder, Invitrogen) foi usado como padrão de peso molecular. Após o término da eletroforese, os amplicons foram visualizados sob luz ultravioleta e fotodocumentados.

## 2.7. Ensaio de formação de biofilme

Para avaliar o potencial de formação de biofilme dos isolados, foi utilizado o método cristal violeta (Stepanovic et al., 2007) realizado em placas de microtitulação de fundo plano de poliestireno de 96 poços utilizando diferentes meios de cultura: Luria Bertani Miller (LB Miller) , LB25%, Caldo Triptose de Soja (TSB), TSB25% e TSB mais LB suplementado com 1% (p / v) de glicose.

As cepas foram semeadas em ágar BHI e incubadas a 37 ° C por 24 h. As colônias foram inoculadas em NaCl 0,85% e homegeinizadas. Posteriormente, a densidade óptica (DO) em 600 nm foi medida e ajustada na faixa de 0,145 a 0,155. A seguir, 20 µL da suspensão bacteriana e 180 µL de

um dos meios de cultura descritos acima foram adicionados ao poço da microplaca. Oito réplicas foram preparadas para cada amostra. A placa foi incubada durante 24 h a 37 ° C. Após esse período, as células não aderidas foram removidas por lavagem com 200 µL de NaCl 0,85% e a coloração foi realizada com 0,4% (p / v) de cristal violeta por 15 min. As células aderidas foram fixadas (30 min) com 200 µL de etanol 100% e a densidade óptica (DO) em 570 nm foi determinada. Os valores médios de cada amostra (ODs) foram determinados em comparação com os OD no controle de esterilidade (ODc). As amostras foram classificadas como formadores de biofilme fortemente ( $4 \times \text{ODc} < \text{ODs}$ ), moderadamente ( $2 \times \text{ODc} < \text{ODs} \leq 4 \times \text{ODc}$ ) ou fracamente ( $\text{ODc} < \text{ODs} \leq 2 \times \text{ODc}$ ).

## Resultados

### 3.1. Identificação bacteriana

A identificação taxonômica dos isolados foi confirmada pela análise de MALDi-TOF-MS, com valores de pontuação entre 2.300 e 2.700, indicando altos índices de compatibilidade e confiabilidade (Tabela 2).

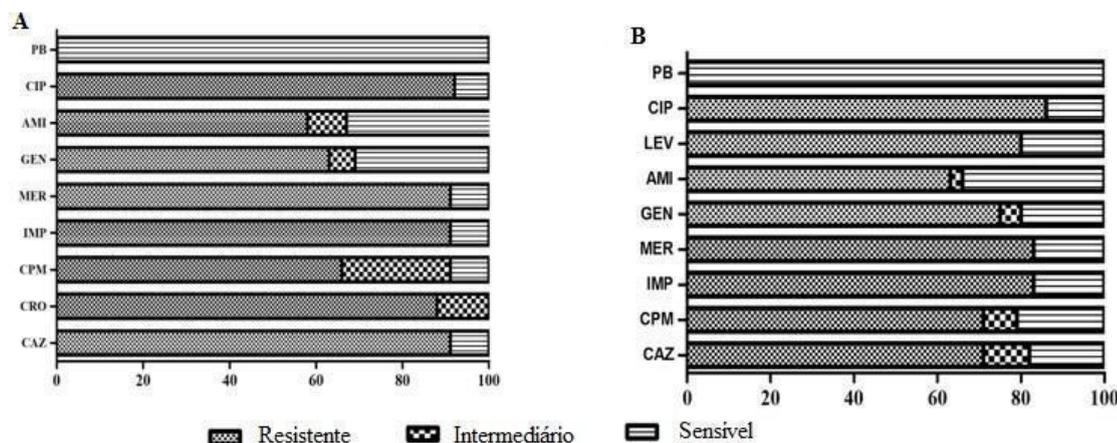
### 3.2. Perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos

Trinta e dois isolados de *A. baumannii* (88,6%) apresentaram perfil XDR e três (9,57%) foram resistentes a menos de três classes de antimicrobianos (perfil N-MDR). Não foi detectado nenhum isolado MDR para esta espécie. Em relação aos isolados de *P. aeruginosa*, 55 (85,49%) foram considerados XDR, nove (13,84%) foram MDR e apenas um (1,53%) foi N-MDR. A origem mais frequente dos isolados para ambas as espécies foi a secreção traqueal (36%), seguida da urina (17%) e líquido cefalorraquidiano (11%). O setor hospitalar que apresentou o maior percentual de pacientes infectados pelas duas espécies foi a Unidade de Terapia Intensiva (UTI), totalizando 39% dos isolados.

Foi avaliado o perfil de resistência dos isolados de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* aos nove antibióticos testados (Fig. 1) e comparada a porcentagem entre os setores e os diferentes hospitais investigados, ver resultados descritos a seguir (Tabela 2). A droga que apresentou menor poder de ação contra as duas espécies foi a ciprofloxacina (classe das fluoroquinolonas), sendo 91,4% e 84,6% dos isolados resistentes de *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, respectivamente. Para os demais antibióticos, as duas espécies apresentaram perfis de resistência distintos, sendo principalmente resistentes ao grupo dos  $\beta$ -lactâmicos (imipenem, meropenem, ceftazidima e ceftriaxona). Todos os isolados foram sensíveis à polimixina B.

Em relação à distribuição dos perfis de resistência, verificou-se que tanto no hospital 1 quanto no hospital 2 foram encontrados isolados XDR e N-MDR (Tabela 2). No hospital 1 foram observados 75% de XDR e 25% N-MDR de isolados de *A. baumannii* e 76,3% de XDR e 23,7% de MDR de *P. aeruginosa*. Por outro lado, para o hospital 2, 100% dos isolados de *A. baumannii* eram XDR, enquanto 81,5% eram XDR, 14,8% MDR e 3,7% N-MDR para *P. aeruginosa*.

Fig 1. Perfis de susceptibilidade antimicrobiana de isolados de *A. baumannii* e *P. aeruginosa*



PB, Polimixina B; CIP, Ciprofloxacina; AMI, Amicacina; GEN, gentamicina; MER, Meropenem; IMP, Imipenem; CPE, Cefepime; CRO, Ceftriaxona; CAZ, Ceftazidima.

#### Detecção e frequência genotípica dos genes blaSHV, blaKPC, blaIMP e blaVIM

Dentre os isolados testados, 39 (22,85% de *A. baumannii* e 38,46% de *P. aeruginosa*) apresentaram o genótipo SHV do gene blaSHV, enquanto 60 (54,28% de *A. baumannii* e 63,07% de *P. aeruginosa*) apresentaram o genótipo KPC para blaKPC. O genótipo IMP de blaIMP foi detectado em apenas um isolado de *A. baumannii* (2,85%) e o genótipo VIM de blaVIM, em oito isolados (2,8% em *A. baumannii* e 7,69% em *P. aeruginosa*). A combinação de genes mais frequentemente observada foi entre blaSHV + blaKPC (26%), genótipo SHV + KPC, seguido por blaKPC + blaVIM (3%), blaSHV + blaVIM (2%) e blaSHV + blaKPC + blaVIM (1%). Associação entre os quatro genes estudados não foi identificada em nenhuma amostra (Tabela 2).

Tabela 2. Identificação de isolados bacterianos por aquisição de espectro de massa, hospital (setor), local de infecção, perfil de resistência, formação de biofilme e genótipo

Isolados	Scores	Setor Hospitalar	Sítio de Infecção	Perfil de Suceptibilidade	Abilidade de Formação de Biofilme	Genótipo
A.438.4	2.376	Neurologia	Líquido Cefalorraquidiano	N-MDR	Forte	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
A.473.4	2.309	UAN	Líquido Cefalorraquidiano	N-MDR	Moderado	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
A.557.4	2.35	Sala de Recuperação	Urina	XDR	Forte	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
A.749.4	2.46	Emergencia	Secreção Traqueal	XDR	Moderado	<i>bla<sub>SHV+</sub> bla<sub>KPC</sub></i>
A.789.4	2.300	UTI	Líquido Cefalorraquidiano	XDR	Moderado	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
A.895.4	2.355	UTI	Secreção Traqueal	XDR	Moderado	<i>bla<sub>SHV+</sub> bla<sub>KPC</sub></i>
A.898.4	2.366	UTI	Secreção Traqueal	XDR	Moderado	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
A.619.5	2.289	Neurologia	Abscesso	XDR	Fraco	<i>bla<sub>KPC</sub>+bla<sub>IM</sub></i>
A.620.5	2.39	Neurologia	Abscesso	XDR	Forte	-
A.62.6	2.61	Pediatria	Líquido Cefalorraquidiano	XDR	Moderado	<i>bla<sub>SHV+</sub> bla<sub>KPC</sub></i>
A.223.6	2.344	Pediatria	Líquido Cefalorraquidiano	N-MDR	Forte	-
A.452.6	2.390	Neurologia	Ferida operatória	XDR	Moderado	-
A.8687	2.099	UTI	Sangue	XDR	Forte	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
A.8710-1	2.283	UCO	Secreção Traqueal	XDR	Forte	<i>bla<sub>KPC</sub>+bla<sub>VIM</sub></i>
A.8747	2.306	UTI	Secreção Traqueal	XDR	Forte	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
A.8896	2.354	UCO	Secreção Traqueal	XDR	Forte	<i>bla<sub>SHV</sub></i>
A.9450	2.542	UTI	Sangue	XDR	Forte	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
A.9733-2	2.387	Emergencia	Sangue	XDR	Forte	<i>bla<sub>SHV</sub></i>
A.10865	2.559	UTI	Secreção Traqueal	XDR	Forte	-
A.10986	2.333	UTI	Secreção Traqueal	XDR	Forte	-
A.11229	2.324	UTI	Catheter tip	XDR	Forte	-
A.11471	2.449	UTI	Secreção Traqueal	XDR	Forte	<i>bla<sub>SHV</sub></i>
A.11481	2.385	Cardiologia	Secreção Traqueal	XDR	Forte	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
A.11562	2.452	Emergencia	Sangue	MDR	Forte	<i>bla<sub>SHV+</sub>bla<sub>VIM</sub></i>
A.11580	2.388	Clínica cirúrgica	Sangue	XDR	Forte	<i>bla<sub>VIM</sub></i>
A.11596	2.512	UCO	Secreção Traqueal	XDR	Forte	-
A.11531	2.476	UCO	Sangue	XDR	Forte	-
A.12156	2.588	UCO	Sangue	XDR	Forte	<i>bla<sub>SHV+</sub> bla<sub>KPC</sub></i>
A.12166	2.426	ICU	Secreção Traqueal	XDR	Forte	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
A.14700	2.409	UCO	Secreção Traqueal	XDR	Moderado	-
A.14731	2.799	UCO	Secreção Traqueal	XDR	Forte	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
A.14808	2.453	UTI	Secreção Traqueal	XDR	Moderado	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
A.14900	2.469	Emergencia	Secreção Traqueal	XDR	Moderado	-
A.14967	2.511	UCO	Secreção Traqueal	XDR	Forte	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
A.15166	2.581	UCO	Secreção Traqueal	XDR	Forte	-
P.535.4	2.388	Neurologia	Urina	XDR	Forte	<i>bla<sub>SHV</sub></i>
P.538.4	2.289	Neurologia	Urina	XDR	Forte	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
P.554.4	2.373	Pediatria	Secreção Oral	MDR	Forte	<i>bla<sub>SHV</sub></i>
P.555.4	2.655	Pediatria	Secreção Oral	MDR	Forte	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
P.586.4	2.459	UCEN	Couro Cabeludo	XDR	Forte	-
P.661.4	2.245	UTI	Urina	MDR	Forte	-
P.670.4	2.387	Pediatria	Ferida	XDR	Forte	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
P.680.4	2.301	UTI	Líquido Cefalorraquidiano	XDR	Moderado	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
P.683.4	2.314	Unidade de Trauma	Abscesso	MDR	Forte	<i>bla<sub>SHV+</sub>bla<sub>KPC</sub></i>
P.732.4	2.678	UTI	Líquido Peritoneal	XDR	Forte	<i>bla<sub>SHV+</sub>bla<sub>KPC</sub></i>
P.810.4	2.428	UTI	Urina	XDR	Forte	<i>bla<sub>SHV+</sub>bla<sub>KPC</sub></i>
P.824.4	2.377	UTI	Secreção Traqueal	XDR	Forte	<i>bla<sub>SHV+</sub>bla<sub>KPC</sub></i>
P.837.4	2.449	UTI	Secreção Traqueal	XDR	Forte	<i>bla<sub>KPC</sub></i>

P.876.4	2.469	UCEN	Líquido Cefalorraquidiano	XDR	Forte	<i>bla<sub>SHV</sub>+bla<sub>KPC</sub></i>
P.921.4	2.345	UTI	Líquido Peritoneal	XDR	Forte	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
P.528.5	2.301	Clínica	Escala	XDR	Forte	<i>bla<sub>SHV</sub>+bla<sub>KPC</sub></i>
P.552.5	2.314	UTI	Secreção Traqueal	XDR	Forte	<i>bla<sub>KPC</sub>+bla<sub>VIM</sub></i>
P.603.5	2.398	UAN	Urina	MDR	Fraco	-
P.666.5	2.308	Neurologia	Líquido Cefalorraquidiano	XDR	Moderado	<i>bla<sub>SHV</sub>+bla<sub>KPC</sub></i>
P.717.5	2.324	BTU	Urina	XDR	Forte	<i>bla<sub>SHV</sub>+bla<sub>KPC</sub></i>
P.841.5	2.999	Neurologia	Líquido Cefalorraquidiano	XDR	Forte	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
P.936.5	2.389	UTI	Líquido Cefalorraquidiano	XDR	Forte	<i>bla<sub>SHV</sub>+bla<sub>KPC</sub></i>
P.1058.5	2.659	BTU	Urina	XDR	Forte	-
P.1087.5	2.301	Clínica cirúrgica	Urina	XDR	Forte	<i>bla<sub>SHV</sub>+bla<sub>VIM</sub></i>
P.1098.5	2.432	Neurologia	Líquido Cefalorraquidiano	XDR	Forte	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
P.64.6	2.777	Enfermaria	Ferida Operatoria	XDR	Fraco	<i>bla<sub>SHV</sub></i>
P.75.6	2.504	Ambulatório	Urina	XDR	Forte	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
P.96.6	2.309	UTI	Secreção Traqueal	XDR	Forte	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
P.98.6	2.455	UTI	Secreção Traqueal	XDR	Forte	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
P.170.6	2.426	UTI	Urina	XDR	Forte	-
P.198.6	2.670	Unidade de Trauma	Fragmento de Osso	XDR	Forte	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
P.199.6	2.345	Unidade de Trauma	Fragmento de Medula Óssea	XDR	Forte	<i>bla<sub>SHV</sub>+bla<sub>KPC</sub></i>
P.235.6	2.337	UTI	Urina	XDR	Forte	<i>bla<sub>SHV</sub>+bla<sub>KPC</sub></i>
P.244.6	2.936	Clínica cirúrgica	Urina	MDR	Moderado	<i>bla<sub>KPC</sub>+bla<sub>VIM</sub></i>
P.332.6	2.469	Neurologia	Ponta de Cateter	XDR	Moderado	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
P.432.6	2.427	ANSU	Secreção Traqueal	MDR	Moderado	<i>bla<sub>SHV</sub>+bla<sub>KPC</sub></i>
P.484.6	2.307	Unidade de Trauma	Abcesso	MDR	Forte	<i>bla<sub>SHV</sub>+bla<sub>KPC</sub></i>
P.545.6	2.309	UTI	Secreção Traqueal	MDR	Forte	<i>bla<sub>SHV</sub>+bla<sub>KPC</sub></i>
P.8305	2.538	UTI	Secreção Traqueal	XDR	Forte	<i>bla<sub>VIM</sub></i>
P.8410	2.48	UCO	Secreção Traqueal	XDR	Forte	-
P.8662	2.474	UTI	Secreção Traqueal	MDR	Forte	<i>bla<sub>SHV</sub></i>
P.8665	2.502	Emergencia	Urina	XDR	Forte	<i>bla<sub>SHV</sub>+bla<sub>KPC</sub></i>
P.8697	2.408	UTI	Urina	XDR	Forte	<i>bla<sub>SHV</sub></i>
P.8843	2.538	Emergencia	Urina	XDR	Forte	-
P.8999	2.488	Clínica Vascular	Secreção	XDR	Forte	-
P.9128	2.464	UCO	Ponta de Cateter	XDR	Forte	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
P.9362	2.498	UTI	Sangue	XDR	Forte	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
P.9392	2.459	UTI	Sangue	N-MDR	Forte	-
P.9367	2.412	UTI	Urina	XDR	Forte	-
P.9474	2.496	UTI	Secreção Traqueal	XDR	Forte	<i>bla<sub>SHV</sub>+bla<sub>KPC</sub></i>
P.9688-1	2.459	UTI	Secreção Traqueal	XDR	Forte	<i>bla<sub>SHV</sub>+bla<sub>KPC</sub></i>
P.9798-2	2.459	Cardiologia	Secreção Traqueal	MDR	Forte	-
P.11256	2.521	UTI	Secreção Traqueal	MDR	Forte	<i>bla<sub>KPC</sub></i>
P.11394	2.428	Clínica Vascular	Ponta de Cateter	XDR	Forte	-
P.11557	2.495	UCO	Secreção Traqueal	XDR	Forte	<i>bla<sub>SHV</sub>+bla<sub>KPC</sub></i>
P.11739	2.531	UTI	Secreção Traqueal	XDR	Forte	-
P.11807	2.44	Clínica cirúrgica	Secreção Retroperitoneal	XDR	Forte	-
P.11809	2.447	Clínica cirúrgica	Tecido	MDR	Forte	-
P.11877	2.552	Clínica Vascular	Tecido	XDR	Forte	-
P.11914	2.387	Clínica	Secreção Traqueal	XDR	Forte	-
P.14325	2.51	UTI	Ponta de Cateter	XDR	Forte	<i>bla<sub>SHV</sub>+bla<sub>KPC</sub></i>
P.14357	2.428	UCO1	Swab Retal	XDR	Forte	<i>bla<sub>SHV</sub>+bla<sub>KPC</sub></i>
P.14685	2.535	UTI	Secreção Traqueal	XDR	Moderado	<i>bla<sub>SHV</sub>+bla<sub>KPC</sub></i>
P.16304	2.473	UTI	Urina	XDR	STRONG	<i>bla<sub>SHV</sub>+bla<sub>KPC</sub>+bla<sub>VIM</sub></i>
P.16025	2.400	Emergencia	Sangue	XDR	STRONG	<i>bla<sub>SHV</sub>+ bla<sub>KPC</sub></i>

A: *A. baumannii* P: *P. aeruginosa* UAN- Unidade Avançada de Neurocirurgia UCO- Unidade Coronariana UQ- Unidade de Queimados UTI- Unidade de Tratamento Intensivo

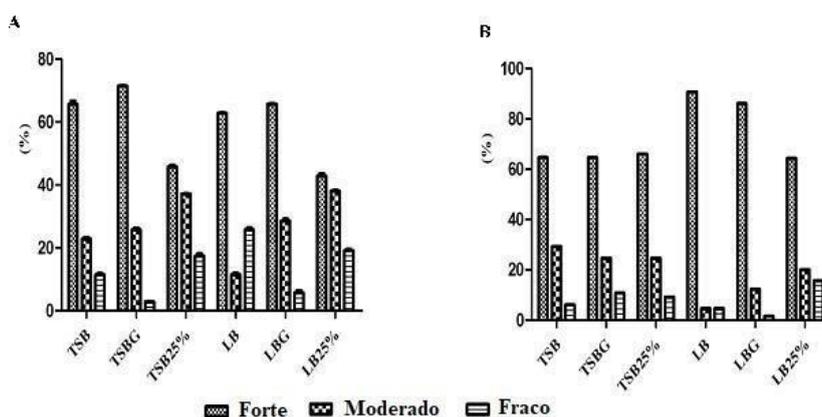
### Sequenciamento de genes de resistência

O sequenciamento dos amplicons confirmou a identidade molecular dos fragmentos amplificados revelando alto nível de similaridade e homologia dos genes IMP, SHV, VIM e KPC (superior a 97%) quando comparados com as sequências depositadas no GENBANK.

### Formação de biofilme em diferentes meios de crescimento

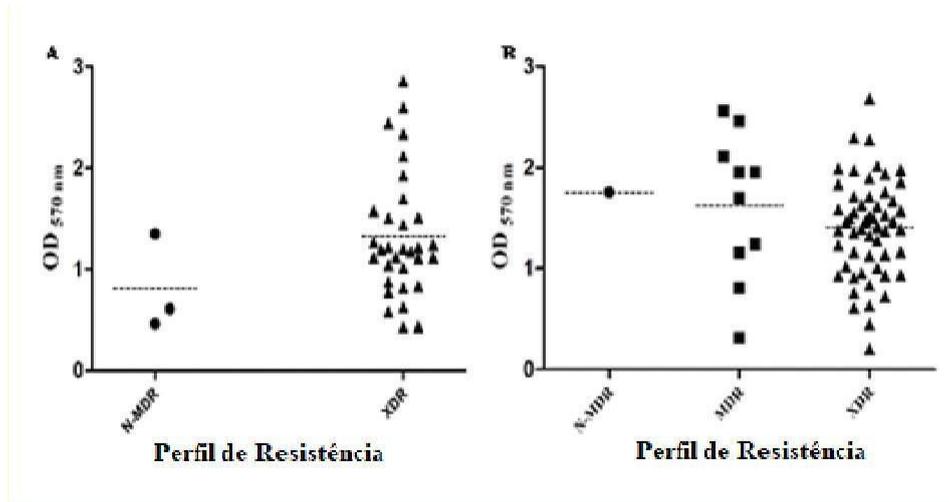
Todos os isolados analisados formaram biofilme nos meios testados (TSB, TSBG, TSB25%, LB, LBG, LB25%), mas com intensidades diferentes. Em *A. baumannii*, o meio TSB suplementado com glicose (TSBG) foi o que proporcionou uma maior formação de biofilme enquanto para *P. aeruginosa* foi o meio LB (Fig. 2).

Fig 2. Formação de biofilme em diferentes meios de crescimento por isolados de *A. baumannii* (A) e *P. aeruginosa* (B).



Entre os 35 isolados de *A. baumannii*, 24 (68,6%) mostraram-se fortes formadores de biofilme (23 XDR e um N-MRD), 10 (28,6%) foram formadores moderados (nove XDR e um N-MDR) e apenas um (2,9%) eram formadores fracos, mostrando um perfil de XDR (Figura 3A). Em relação aos 65 isolados de *P. aeruginosa*, 59 (90,8%) mostraram-se formadores fortes (47 XDR, 11 MDR e um N-MDR), três (4,6%) foram formadores moderados (dois XDR e um MDR) e três (4,6%) eram formadores fracos (dois XDR e um MDR).

Não foi possível correlacionar o perfil de resistência com a capacidade de formação de biofilme. Nas duas espécies, os isolados XDR foram encontrados como formadores fortes, moderados e fracos. A Fig. 3 mostra a distribuição dos isolados de acordo com o perfil de resistência e a capacidade de formação de biofilme.

Fig 3. Formação de biofilme e correlação do perfil de resistência para isolados de *A. baumannii* (A) e *P. aeruginosa* (B).

## Discussão

No presente estudo, a identificação dos isolados foi realizada inicialmente pelo laboratório dos hospitais por meio do método automatizado descrito na metodologia. Posteriormente, a identidade foi confirmada por MALDI-TOF-MS com base na análise de proteínas. Esta técnica gera espectros de massa das proteínas do microrganismo desconhecido fornecendo uma impressão digital proteômica, que é então comparada a um banco de dados de referência, levando a uma identificação precisa no nível de gênero e espécie (Wattal et al., 2016). As identidades de todos os isolados bacterianos foram confirmadas, com 100% de concordância entre os resultados obtidos e os registros do banco de dados.

A identificação rápida e precisa dos patógenos é de fundamental importância para a terapia antimicrobiana, uma vez que permite intervenções clínicas específicas, facilitando o tratamento e, conseqüentemente, reduzindo custos. A técnica MALDI-TOF-MS tem o potencial de substituir ou complementar as técnicas convencionais de identificação de cepas bacterianas e fúngicas, reduzindo o tempo necessário para obtenção de resultados de 24 a 48 h para menos de uma hora. Apesar do custo significativo do instrumento e da manutenção, os gastos com custos operacionais e reagentes são inferiores aos de outros métodos convencionais, tornando essa tecnologia uma ferramenta importante para a rotina clínica (Wattal et al., 2016).

As infecções causadas por bactérias XDR e MDR são extremamente difíceis de tratar. O teste de sensibilidade aos antimicrobianos mostrou que os isolados de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* aqui estudados apresentaram altos níveis de resistência à maioria dos antibióticos testados. Isolados de *A. baumannii* apresentaram resistência superior a 90% às cefalosporinas de terceira geração e 65% às de segunda geração. Além disso, apresentava resistência superior a 90% aos carbapenêmicos, que costumam ser os fármacos de escolha para o tratamento dessas infecções (Doi et al., 2015; Potron; Poirel; Nordmann, 2015; Duarte et al., 2016). Além disso, aproximadamente 60% dos isolados foram resistentes aos aminoglicosídeos e 90% à fluoroquinolona testada. Todos os isolados eram suscetíveis à polimixina, que permanecia, então, a única opção de tratamento. Esses resultados reforçam a necessidade de abordar novas alternativas terapêuticas. Resultados semelhantes foram relatados por outros autores que demonstraram o elevado número de resistência dos isolados desta espécie a antibióticos de diferentes classes de ação (Qui et al., 2016; Duarte et al., 2016).

A maioria dos isolados de *P. aeruginosa* apresentou resistência a fluoroquinolona (86%), cefalosporinas (70%) e aminoglicosídeos (mais de 60%). Todos eram sensíveis à polimixina. O alto

índice de resistência aos antibióticos foi relatado por outros autores, contrastando apenas na porcentagem encontrada (Domenico et al., 2017). Esses dados demonstram a relevância do estudo e apontam a necessidade de monitoramento do perfil de disseminação de resistência desses patógenos no ambiente hospitalar, uma vez que os isolados XDR e MDR foram detectados em diferentes setores dos hospitais. A identificação de clones MDR e XDR em diversos setores (incluindo emergência e ambulatório) revela o alto risco de disseminação desses patógenos.

O frequente isolamento de cepas produtoras de ESBL, com variantes do tipo CTX-M, no Brasil é mais comum do que as enzimas TEM e SHV prevalentes na América do Norte e Europa Ocidental, que levam ao fracasso da terapia pela administração de cefalosporinas de primeira e segunda geração. Esse fato contribuiu para a escolha do tratamento com carbapenêmicos; no entanto, isso levou ao aparecimento e disseminação de carbapenemases (KPC-2, SPM-1, PXA-23, IMP-1 e OXA-143) em todo o Brasil, principalmente associadas a infecções associadas a cuidados de saúde (HAI) (Silva, Lincopan, 2012). A taxa de infecções nosocomiais por  $\beta$ -lactamases de espectro estendido no Brasil está entre as mais altas do mundo (Guzman-Blanc et al., 2014; Jacome et al., 2016). No presente estudo, a alta incidência de genes beta-lactâmicos (KPC (60%), SHV (36%), VIM (10%) e IMP (1%)) é indicativa da necessidade de implementação de medidas eficazes para o controle de infecções por meio de programas de vigilância microbiológica e monitoramento dos padrões de resistência aos antimicrobianos, a fim de reduzir as taxas de morbimortalidade por esses microrganismos e os custos hospitalares.

Foi possível comparar e confirmar os perfis de resistência por métodos bioquímicos, com a presença dos genes de resistência investigados, exceto para algumas cepas (duas de *A. baumannii* e seis de *P. aeruginosa*) que foram positivas para o gene KPC, mas não expressaram resistência a carbapenemos. Esse resultado se deve ao fato de que a aquisição dos genes das carbapenemases nem sempre é suficiente para garantir a resistência. Uma supressão genética que leva ao silenciamento do gene ou mesmo à presença de outros mecanismos de resistência pode impedir a evidência fenotípica (Peleg et al., 2005; Cabral et al., 2012).

Dentre todos os genes investigados, o KPC foi o mais abundante, presente em 60% dos isolados (54,3% de *A. baumannii* e 63,1% de *P. aeruginosa*). A primeira classe de drogas de escolha para o tratamento de infecções por esses microrganismos são os carbapenêmicos, mas o aumento da ocorrência desse gene limitou as opções terapêuticas, aumentando as taxas de mortalidade e muitas vezes restringindo as opções de tratamento para polimixinas ou tigelina (Cabral et al., 2012; Duarte et al., 2016). O primeiro relato de um gene blaKPC em *P. aeruginosa* no Brasil ocorreu em Recife

(Jacome et al., 2012). Estudos anteriores detectaram a presença de blaKPC em 25,8% na mesma espécie (Jacome et al., 2016). No presente estudo, essa detecção aumentou.

Um fator de virulência que merece atenção em microrganismos é a capacidade de formação de biofilme. Em *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, essa capacidade contribui significativamente para a persistência e versatilidade dessas espécies em causar infecções nosocomiais. A formação de biofilme permite que essas bactérias cresçam em ambientes desfavoráveis, tornando-se um importante problema médico devido à aderência em equipamentos médicos como cateteres e tubos endotraqueais, representando um risco significativo para os pacientes (Mc Connell, Actis, Pachon, 2012, Hardard et al., 2012, Gellatly, Hancock, 2013, Lemos et al., 2013).

Todos os isolados investigados de ambas as espécies formaram biofilme nos diferentes meios testados, mas com intensidades diferentes. *A. baumannii* apresentou maior formação de biofilme no meio TSBG (64,6%), enquanto *P. aeruginosa* apresentou maior capacidade no meio LB (90,8%). Ressalta-se que apenas a última espécie respondeu aos tratamentos de estresse quando submetida à variação do meio TSB para formação de biofilme. Observou-se um maior número de isolados formadores de biofilme quando submetidos ao meio TSB 25% quando comparados aos resultados obtidos em meio TSB em concentrações normais e em meio TSB mais glicose. Esse resultado possivelmente se deve ao fato de que, quando exposto a condições de estresse, o microrganismo aumentou sua patogenicidade e síntese de fatores de virulência. Nesse caso, uma baixa concentração de suplementos pode ter levado a uma maior formação de biofilme (Laila; Santos, 2016).

No presente estudo, o perfil de forte formador de biofilme em ambas as espécies foi predominante, independente da susceptibilidade aos antimicrobianos. Esses dados demonstram o crescente grau de virulência dessas espécies e a gravidade do quadro de infecção por elas causado. Atualmente, existem diferenças entre os autores sobre a relação entre a capacidade de formação de biofilme e o fenótipo de resistência antimicrobiana. Alguns estudos com *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, além de outras espécies, afirmam que existe uma relação positiva entre esses dois eventos, onde o perfil MDR está diretamente ligado à alta formação de biofilme (Gurung et al., 2013; Reiter et al., 2011; Sanchez et al., 2013; Abidi et al, 2013). No entanto, outros autores concluíram que existe uma possível relação inversa entre resistência e produção de biofilme, ou seja, a formação de biofilme está diretamente relacionada ao perfil N-MDR (Rodríguez-Baño et al., 2008; Perez et al., 2015; Qui et al., 2016). No entanto, no presente estudo não houve relação significativa entre a produção de biofilme e os fenótipos de resistência, indicando a presença de eventos multifatoriais demonstrando que a formação de biofilme é uma característica intrínseca dos patógenos investigados (Duarte et al., 2016, Domenico et al, 2017).

Estudos anteriores demonstraram que a presença de plasmídeos contendo genes para  $\beta$ -lactamases classes A e D tem o potencial de causar distúrbios nas estruturas de adesão bacteriana essenciais para a formação de biofilme e motilidade bacteriana. Esta propriedade foi observada em cepas de *E. coli* e *P. aeruginosa* e é específica apenas para essas classes. OC e B não apresentaram essa propriedade (Gallant et al., 2005). Porém, no presente estudo,  $\beta$ -lactamases classe A (SHV e KPC) não demonstraram influência antibiofilme nos isolados testados, demonstrando potencial de virulência ainda maior nessas espécies. Este estudo apresenta a diversidade genética e bioquímica dos isolados investigados e reforça a importância do monitoramento contínuo desses patógenos em ambientes hospitalares.

## Conclusão

A alta diversidade de perfis microbianos observada em isolados de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* demonstra a dificuldade na escolha efetiva do tratamento para esses microrganismos. Esses dados são preocupantes, pois revelam o atual cenário crítico das infecções hospitalares, apontando para a necessidade de monitoramento contínuo, com vigilância epidemiológica dessas infecções, ajudando a minimizá-las ou mesmo eliminá-las no ambiente hospitalar.

## Referências

- Akhi, M. T.; Khalili, Y.; Ghotaslou, R.; Yousefi, S.; Kafil, H. S.; Naghili, B.; Sheikhalizadeh, V. Evaluation of Carbapenem Resistance Mechanisms and Its Association with *Pseudomonas aeruginosa* Infections in the Northwest of Iran. *Microbial Drug Resistance*. 00 (00): 1-10, 2017.
- Atashili, J., Lyonga, E. E., Mandi, H., Ikomey, G., Mukwele, B., and Eyoh, A. B. (2014). Relationship between multiple drug resistance and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolated from medical and non-medical personnel in Yaoundé, Cameroon. *Pan Afr. Med. J.* 17:186.
- Bilal, M.; Rasheed, T.; Iqbal, H. M. N.; Hu, H.; Wang, W.; Zhang, X. Macromolecular agents with antimicrobial potentialities: A drive to combat antimicrobial resistance. *International Journal of Biological Macromolecules*. 103: 554–574, 2017.
- Cabral, A. B.; Melo, R. C. A.; Maciel, M. A. V.; Lopes, A. C. S. L.; Multidrug resistance genes, including *blaKPC* and *blaCTX-M-2*, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brasil; *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 45(5):572-578, Sep-Oct, 2012.
- Clsi. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informat. Supplement - M100-S24. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014.
- Connell, M. J., Actis, L., Pachon, J.; *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiol Rev* 37 (2013) 130–155.
- Croxatto, A. Prod'hom, G. Greub. G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev*. 36 (2012) 380–407.
- Doi, Y. Murray, G. Peleg, A. *Acinetobacter baumannii*: evolution of antimicrobial resistance-treatment options, *Semin. Respir. Crit. Care Med*. 36(2015) 085–098.

- Domenico, E. G. D.; Farulla, I.; Prignano, G.; Gallo, M. T.; Vespaziani, M.; Cavallo, I.; Sperduti, I.; Pontone, M.; Bordignon, V.; Cilli, L.; Santis, A.; Salvo, F.; Pimpinelli, F.; Parola, I. L. L.; Toma, L.; Ensoli, F.; Biofilm is a Major Virulence Determinant in Bacterial Colonization of Chronic Skin Ulcers Independently from the Multidrug Resistant Phenotype; *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18, 1077;
- Dong F, Xu Xi-wei, Song Wen-qi, Lü Ping, Yu Sang-jie, Yang Yong-hong, et al. Characterization of multidrug-resistant and metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a pediatric clinic in China. *Chin Med J* 2008; 121:1611-1616.
- Duarte, A.; Ferreira, S.; Almeida, S.; Domingues, F. C.; Clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from a Portuguese hospital: PFGE characterization, antibiotic susceptibility and biofilm-forming ability *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 45 (2016) 29-33.
- Elramalli, A.; Almshawt, N.; Ahmed, M. O. Current challenges and emergence of carbapenemase-producing bacteria: a brief report from a Libyan hospital. *Pan Afr Med J.* 29 (26):180, 2017.
- Erdönmez, D.; Rad, A. Y.; Aksöz, N. Quorum sensing molecules production by nosocomial and soil isolates *Acinetobacter baumannii*. *Arch Microbiol.* 1–10, 2017.
- Gallant, C. V.; Daniels, C.; Leung, J. M.; Ghosh, A. S.; Young, K. D.; Kotra, L. P.; Burrows, L. L.; Common  $\beta$ -lactamases inhibit bacterial biofilm formation; *Molecular Microbiology* v. 58 (4), 1012–1024 2005.
- Gellatly, S. L.; Hancock, R. E. W.; *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and Disease*. 67, 159–173, 2013.
- Ghafourian, S.; Sadeghifard, N.; Sekawi, S. Z. Extended Spectrum Beta-lactamases: Definition, Classification and Epidemiology. *Curr. Issues Mol. Biol.* 17: 11-22. 2015.
- Gurung, J.; Kyriem, A. B.; Banik, A.; Lyngdoh, W. V.; Choudhury, B.; Bhattacharyyal, P.; Association of biofilm production with multidrug resistance among clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* from intensive care unit; *Indian Journal of Critical Care Medicine* July-August 2013 Vol 17 Issue 4.
- Guzman-Blanco, M., Labarca, J. A., Villegas, M. V., Gotuzzo, E. & Latin America Working Group on Bacterial Resistance. Resistance Extended spectrum  $\beta$ -lactamase producers among nosocomial Enterobacteriaceae in Latin America. *Braz J Infect Dis* 18, 421-433, 2014.
- Howard, A.; O'donoghue, M.; Feeney, A.; Sleator, R. D. *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen. **Virulence**, v. 3, n. 3, p. 243–50, 1 maio 2012.
- Jacome, P. R. L. A.; Alves, L. R.; Jacome-Junior, A. T.; Silva, M. J. B.; Lima, J. L. C.; Araujo, P. S. R.; Lopes, A. C. S.; Maciel, M. A. V.; Detection of blaSPM-1, blaKPC, blaTEM and blaCTX-M genes in isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. and *Klebsiella* spp. From cancer patients with healthcare-associated infections; *Journal of Medical Microbiology* (2016), 65, 658-665.
- Jacome, P. R. L. A., Alves, L. R., Cabral, A. B., Lopes, A. C. S. & Maciel, M. A. V. (2012b). First Report of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 56, 4990.
- Lahmar, A.; Bedoui, A.; Mokdad-Bzeouichi, I.; Dhaouifi, Z.; Kalboussi, Z.; Cheraif, I.; Ghedira, K.; Chekir-Ghedira, L.; Reversal or resistance in bacteria underlies synergistic effect of essential oils with conventional antibiotics. *Microbial Pathogenesis*, 2016.

- Laila, H. J. E. A.; Santos, R. C. V.; General aspects and molecular mechanisms involved in the formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*. *Disciplinarum Scientia. Série: Ciências da Saúde, Santa Maria*, v. 17, n. 1, p. 125-144, 2016.
- Laxminarayan, R.; Duse, A.; Watal, C.; Zaidi, A. K. M.; Wertheim, H. F. L.; Sumpradit, N.; Vlieghe, E.; Hara, G. L.; Gould, I. M.; Goossens, H.; Greko, C.; So, A. D.; Bigdeli, M.; Tomson, G.; Woodhouse, W.; Ombaka, E.; Peralta, A. Q.; Qamar, F. N.; Mir, F.; Kariuki, S.; Bhutta, Z. A.; Coates, A.; Bergstrom, R.; Wright, G. D.; Brown, E. D.; Cars, O. Antibiotic resistance—the need for global solutions. *The Lancet Infectious Diseases Commission*, v. 13, 2013.
- Lemos, E. V.; Hoz, F. P.; Einarson, T. R.; Mcghan, W. F.; Quevedo, E.; Castañeda, C. And Kawai, K.; Carbapenem resistance and mortality in patients with *Acinetobacter baumannii* infection: systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20: 416–423.
- Leylabadlo, H. E.; Poulak, T.; Bialvaei, A. Z.; Aghazadeh, M.; Asgharzadeh, M.; Kafil, H. S. Extended-Spectrum Beta-Lactamase Producing Gram Negative Bacteria In Iran: A Review. *Afr., J. Infect. Dis.* 11 (2): 39-53, 2017.
- Mathlouthi, N.; El Salabi, A. A.; Jomàa-Jemili, M. B.; Bakour, S.; Al-Bayssari, C.; Zorgani, A. A.; Kraiema, A.; Elahmer, O.; Okdah, L.; Rolain, J.; Chouchani, C. Early detection of metallo- $\beta$ -lactamase NDM-1- and OXA-23 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in Libyan hospitals. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 48 (1): 46-50, 2016.
- Mcconnell, M. J.; Actis, L.; Pachón, J. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiol Rev* 37 (2): 130–155, 2013.
- Nachimuthu, R.; Subramani, R.; Maray, S.; Gothandam, K. M.; Sivamangala, K.; Manohar, P.; Bozdogan, B. Characterization of carbapenem-resistant Gram-negative bacteria from Tamil Nadu. *Journal of Chemotherapy*. 00 (0): 1-4, 2016.
- Nordmann, P. Résistance aux carbapénèmes chez les bacilles à Gram negative. *Medecine/Sciences*. 26 (11): 950-959, 2010.
- Oliveira, A. C.; Silva, R. S.; Díaz, M. E. P.; Iquiapaza, R. A. Resistência bacteriana e mortalidade em um centro de terapia intensiva. *Rev. Latino-Am. Enfermagem*. 18 (6): 1-10, 2010.
- Peleg AY, Franklin C, Bell JM, Spelman DW. Dissemination of the metallo- $\beta$ -lactamase Gene blaIMP-4 among Gram-negative pathogens in a clinical setting in Australia. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 1549-1556.
- Perez, L.R. (2015). *Acinetobacter baumannii* displays inverse relationship between meropenem resistance and biofilm production. *J. Chemother.* 27, 13–16.
- Potron, A. Poirel, L. Nordmann, P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology, *Int. J. Antimicrob. Agents* 45 (2015) 568–585.
- Qi L, Li H, Zhang C, Liang B, Li J, Wang L, Du X, Liu X, Qiu S and Song H.; Relationship between Antibiotic Resistance, Biofilm Formation, and Biofilm-Specific Resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Front. Microbiol.* 7: 483, 2016.
- Rasheed JK, Anderson GJ, Yigit H, Quennan AM, Doménech-Sánchez A, Swenson JM, et al. Characterization of the Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamase Reference strain, *Klebsiella pneumoniae* K6 (ATCC 700603), which Produces the novel enzyme SHV-18. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:2382-2388.

- Reiter, K.C.; Da Silva Paim, T.G.; De Oliveira, C.F.; D'Azevedo, P.A. High biofilm production by invasive multiresistant staphylococci. *APMIS* **2011**, 119, 776–781.
- Rodríguez-Baño, J. Martí, S. Soto, S. Fernández-Cuenca, F. Cisneros, J.M. Pachón, J. et al., Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*: associated features and clinical implications, *Clin. Microbiol. Infect.* 14 (2008)276–278.
- Sanchez, C.J., Jr.; Mende, K.; Beckius, M.L.; Akers, K.S.; Romano, D.R.; Wenke, J.C.; Murray, C.K. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. *BMC Infect. Dis.* **2013**, 13, 47. Seyedjavadi, S. S.; Goudarzi, M.; Sabzehali, F. Relation between blaTEM, blaSHV and blaCTX-M genes and acute urinary tract infections. *Journal of Acute Disease.* 5 (1): 71–76, 2016.
- Silva, k. c.; Lincopan, n. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio • *J Bras Patol Med Lab* v. 48 n. 2 p. 91-99 abril 2012.
- Stepanovic, S. Vukovic, D. Hola, V. Bonaventura, G. Djukic, S. Cirkovic, I. Ruzicka. F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Journal Compilation APMIS.*115 891, 2007.
- Tariq, T. M. Bacteriologic Profile and Antibiogram of Blood Culture Isolates from a Children's Hospital in Kabul. *J Coll Physicians Surg Pak.* 24 (6): 396-399, 2014.
- Tanner, W. D.; Atkinson, R. M.; Goel, R. K.; Toleman, M. A.; Benson, L. S.; Porucznik, C. A.; Vanderslice, J. A. Horizontal transfer of the blaNDM-1 gene to *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in biofilms. *FEMS Microbiol Lett.* 364 (8): 1-6, 2017.
- Wattal, C. Oberoi, J.K. Goel, N. Raveendran, R. Khanna. S. Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for rapid identification of microorganisms in the routine clinical microbiology laboratory. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2016.
- Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, et al. Novel Carbapenem-Hydrolyzing b-lactamase, KPC-1, from a CarbapenemResistant Strain of *Klebsiellapneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 45: 1151-1161, 2001.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- As técnicas utilizadas foram satisfatórias para identificação dos micro-organismos investigados;
- Os diferentes perfis de resistência/suscetibilidade encontrados demonstram a capacidade de adaptação dos patógenos investigados e revelam a problemática terapêutica das infecções causadas por eles;
- A frequência gênica observada demonstra o número crescente de bactérias *KPC*<sup>+</sup>, disseminadas nos hospitais do Recife-PE. Esse dado é preocupante, pois demonstra a inexistência ou ineficiência das ações de vigilância e monitoramento para disseminação de bactérias resistentes no ambiente hospitalar;
- Não foi possível correlacionar o perfil de resistência com a capacidade de formação de biofilme, indicando que essa capacidade parece ser intrínseca as espécies investigadas;
- O presente estudo forneceu dados alarmantes que indicam a elevada e crescente capacidade de adaptação destas espécies no ambiente hospitalar, demonstrando o aspecto problemático do tratamento e erradicação dessas bactérias.

## REFERÊNCIAS

- ALÓS, J. I. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. **EnfermInfeccMicrobiolClin**. v. 33, n.10, p. 692–699, 2015.
- ABIDI, S. H.; SHERWANI, S. K.; SIDDIQUI, T. R.; BASHIR, A.; KAZMI, S. U.; Drug resistance profile and biofilm forming potential of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from contact lenses in Karachi-Pakistan. **BMCO phthalmol**. V. 13:57; 2013.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária.**Boletim Informativo: Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde. Avaliação dos indicadores nacionais de infecção relacionada à assistência ano de 2014 e relatório de progresso**. n. 11, Ano VI, 2015.
- BAQUERO, F.; TEDIM, A. P.; COQUE, T. M. Antibiotic resistance shaping multi-level population biology of bacteria. **Frontiers in Microbiology**. v. 4, 2013.
- BAUMANN, P.; DOUDOROFF, M.; STANIER, R. Y. A study of the Moraxella group II. Oxidative-negative species (genus Acinetobacter). **Journal of bacteriology**. v. 95, n. 5, p. 1520-1541, 1968.
- BEIJERINCK, M. W. Über pigment bildung bei essig bakterien. **Cent Bakteriol Parasitenk**. v. 29, p. 169-76, 1911.
- BIANCHI, S.M. *et al.* Impairment of apoptosis by pyocyanin, a toxic metabolite of *Pseudomonas aeruginosa*. **American journal of respiratory and critical care medicine**. v. 177, n. 1, p. 35-43, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde.**Portaria no 2.616/MS/GM, de 12 de maio de 1998. 12 mai. 1998.**
- BRISOU, J.; PREVOT, A.R. Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under Acromobacter group. In: **Annales de l'Institut Pasteur**. v. 86, n. 6, p. 722-728, 1954.
- BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 39, n. 6, p. 1211-33, 1995.
- BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of beta-lactamases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v. 54, n. 3, p. 969–76, 2010.

BUSH, K.; FISHER, J. F. Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new  $\beta$ -lactamases from gram-negative bacteria. **Annual review of microbiology**. v. 65, p. 455-478, 2011.

CARVALHO, R. M. L. *et al.* Phenotypic detection of metallo- $\beta$ -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from hospitalized patients in São Luis, State of Maranhão, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 46, n. 4, p. 506-509, 2013.

MCCONNELL, M.J.; ACTIS, L.; PACHÓN, J. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. **FEMS microbiology reviews**. v. 37, n. 2, p. 130-155, 2013.

CUENTAS, J. R. *Acinetobacter* un patógeno actual. **Revista de la Sociedad Boliviana de Pediatría**. V.55 n. 1 p. 29-48, 2016.

DUTRA, G. G. *et al.* Nosocomial infection control: role of the nurse. **Revista de Pesquisa: Cuidado é Fundamental Online**. v. 7, n. 1, p. 2159-2168, 2015.

ELRAMALLI, A.; ALMSHAWT, N.; AHMED, M. O. Current challenges and emergence of carbapenemase-producing bacteria: a brief report from a Libyan hospital. **Pan Afr Med J**. v. 29; n. 26 p. 180, 2017.

ESSACK, S. Y. The development of beta-lactam antibiotics in response to the evolution of beta-lactamases. **Pharmaceutical research**. v. 18, n. 10, p. 1391-9, 2001.

FERNANDES, R.; AMADOR, P.; PRUDÊNCIO, C.  $\beta$ -Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. **Reviews in Medical Microbiology**. v. 24, n. 1, p. 7-17, 2013.

FLEMING, A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. **British journal of experimental pathology**. v. 10, n. 3, p. 226-236, 1929.

GELLATLY, S. L.; HANCOCK, R. E. W. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. **Pathogens and Disease**. v. 67, n. 3, p. 159-173, 2013.

GHAFOURIAN, S.; SADEGHIFARD, N.; SEKAWI, S. Z. Extended Spectrum Beta-lactamases: Definition, Classification and Epidemiology. **Curr. Issues Mol. Biol.** v.17 p. 11-22, 2015.

GOMILA M. *et al.* Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. **Frontiers in microbiology**. v. 6, p. 214, 2015.

GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quim. Nova**. v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

HALL-STOODLEY, L.; STOODLEY, P. Evolving concepts in biofilm infections. **Cellular microbiology**. v. 11, n. 7, p. 1034-1043, 2009.

HAUSER, A. R. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. **Nature Reviews Microbiology**. v. 7, n. 9, p. 654-665, 2009.

HOWARD, A.; O'DONOGHUE, M.; FEENEY, A.; SLEATOR, R. D. *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen. **Virulence**. v. 3, n. 3, p. 243-50, 2012.

INFARMED. **Formulário Hospitalar Nacional de Medicamentos** (9ª ed.) Lisboa, 2011.

KIM, D. H., *et al.* A  $\beta$ -Lactamase Resistance Island Including the blaOXA-23 Gene in *Acinetobacter nosocomialis* Isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 56 n. 8, p. 4548-4549, 2012.

KING, J. D. *et al.* Lipopolysaccharide biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. **Innate immunity**. v. 15, n. 5, p. 261-312, 2009.

KIPNIS, E.; SAWA, T.; WIENER-KRONISH, J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. **Medecine et maladies infectieuses**. v. 36, n. 2, p. 78-91, 2006.

LAILA, H. J. E. A.; SANTOS, R. C. V. General aspects and molecular mechanisms involved in the formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*. **Disciplinarum Scientia. Série: Ciências da Saúde, Santa Maria**. v. 17, n. 1, p. 125-144, 2016.

LAM, J. S. *et al.* Genetic and functional diversity of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide. **Frontiers in microbiology**. v. 2, p. 1-25, 2011.

- LAU G.W.; HASSETT D.J.; RAN H & KONG F. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. **Trends in molecular medicine**. v. 10, n. 12, p. 599-606, 2004.
- LEMOS, E. V. *et al.* Carbapenem resistance and mortality in patients with *Acinetobacter baumannii* infection: systematic review and meta-analysis. **Clin Microbiol Infect**. v. 20, p. 416–423, 2014.
- LIELEG, O.; CALDARA, M.; BAUMGARTEL, R.; RIBBECK, K.; Mechanical robustness of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Soft matter**, v. 7, n. 7, p. 3307-3314, 2011.
- LOREIRO, R. J. *et al.* O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista portuguesa de saúde pública**. v. 34 n.1, p. 77-84, 2016.
- LU, S.Y. High diversity of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in an urban river sediment habitat. **Appl. Environ. Microbiol**. v.76, p.5972-5976, 2010.
- MALTEZOU, H. C. Metallo- $\beta$ -lactamases in Gram-negative bacteria: introducing the era of pan-resistance? **International journal of antimicrobial agents**. v. 33, n. 5, p. 1-405, 2009.
- MARTINS, A. F.; BARTH, A. L. *Acinetobacter* multiresistente – um desafio para a saúde pública. **Sci Med**. v. 23, n. 1, p. 56-62, 2013.
- MARTIS, N.; LEROY, S.; BLANC, V. Colistin in multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* blood-stream infections: a narrative review for the clinician. **Journal of Infection**. v. 69, n. 1, p. 1-12, 2014.
- MATSUMOTO, K. Role of bacterial proteases in pseudomonas keratitis. **Biological chemistry**. v. 385, n. 11, p. 1007-1016, 2004.
- MENEZES, J. M. R. M.; PORTO, M. L. S.; PIMENTA, C. L. R. M. Perfil da infecção bacteriana em ambiente hospitalar. **Rev. Ciênc. Méd. Biol**. v. 15, n. 2, p. 199-207, 2016.
- MIAO, E. A. *et al.* TLR5 and Ipaf: dual sensors of bacterial flagellin in the innate immune system. In: **Seminars in immunopathology**. v. 29, n. 3, p. 275-288, 2007.
- MIKKELSEN, H.; SIVANESON, M.; FILLOUX, A. Key two-component regulatory systems that control biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. **Environmental microbiology**. v. 13, n. 7, p. 1666-1681, 2011.
- MONROE, D. Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. **PLoS Biology**. V. 5, n. 11, p. 307, 2007.

MULCAHY, L. R.; ISABELLA, V. M.; LEWIS, K. Pseudomonasaeruginosabiofilms in disease. **Microbial ecology**. v. 68, n. 1, p. 1-12, 2014.

NADEEM, S. G. *et al.* Comparisonofthe in vitro susceptibilityofClinicalisolatesofPseudomonasaeruginosa. **British Journalof medical Practitioners**. v. 2, n. 4, p. 35-39, 2009.

NATHWANI, D.*et al.* Clinicalandeconomicconsequencesof hospital-acquiredresistantandmultidrug-resistantPseudomonasaeruginosainfections: a systematicreviewand meta-analysis. **Antimicrobialresistanceandinfectioncontrol**. v. 3, n. 1, p. 32, 2014.

NORDMANN, P.; DORTET, L.; POIREL, L. Carbapenemresistance in Enterobacteriaceae: hereisthestorm. **Trends in molecular medicine**. v. 18, n. 5, p. 263-72, 2012.

OCHOA, S. A. *et al.* Características patogénicas de cepas de Pseudomonasaeruginosa resistentes a carbapenémicos, asociadasconlaformación de biopelículas. **Boletín Médico del Hospital Infantil de México**. v. 70, n. 2, p. 138-150, 2013.

OLIVEIRA, A.C.; KOVNER, C.T.; SILVA, R.S. Nosocomial Infection in an intensive care unit in a Brazilian University Hospital. **Revista Latino-americana de Enfermagem**. v. 18, p. 233-239, 2010.

PATIÑO, M. G. G., CONTRERAS, R. G., LIMÓN, P. L. The Immune Response againstAcinetobacterbaumannii, anEmergingPathogen in Nosocomial Infections. **Frontiers in Immunology**. v. 8, 2017.

PEDROSA, A. P. *et al.* Pesquisa de fatores de virulência em Pseudomonasaeruginosa isoladas de águas minerais naturais. **Ambiente & Água - AnInterdisciplinaryJournalofApplied Science**. v. 9, n. 2, p. 313-324, 2014.

PINTO, C. C. F. Avaliação da penetração de agentes antimicrobianos em biofilme de *Staphylococcus* spp. e *Pseudomonasaeruginosa*: considerações físico-químicas. **Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.**

Qi L, Li H, Zhang C, Liang B, Li J, Wang L, Du X, Liu X, Qiu S and Song H.; Relationship between Antibiotic Resistance, Biofilm Formation, and Biofilm-Specific Resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Front. Microbiol.** v. 7 p. 483. 2016.

ROBLEDO, I. E., *et al.* Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.54, n. 3, p. 1354–1357, 2012.

SANTOS, A. K. S.; ARAÚJO, J. A.; CARVALHO, M. M. *et al.* Microbiological profil of nosocomial infections at intensive care units. **Jornal of Nursing UFPE online**.v. 10, n. 3, p. 1432-1440, 2016.

SEYEDJAVADI, S. S.; GOUDARZI, M.; SABZEHALI, F. Relation between blaTEM, blaSHV and blaCTX-M genes and acute urinary tract infections. **Journal of Acute Disease**. 5 (1): 71–76, 2016.

SILVA, K. C.; LINCOPAN, N. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. **J. bras. patol. med. lab**. v. 48, p. 91-99, 2012.

SOUZA, E. S.; BELEI, R. A. *et al.* Mortalidadeeriscos associados a infecção relacionadaà assistência à saúde. **Texto Contexto Enfermagem**.v. 24, n. 1, p.220-228, 2015.

SUÁREZ, C. J. *et al.* Resistancemechanismstocarabapenems in *P. aeruginosa*, *Acinetobacterbaumannii*and *Enterobacteriaceae*andstrategies for preventionandcontrol. **Infectio**. v. 10, n. 2, p. 85-93, 2006.

TRENTIN, D. S.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**.v. 14, n. 22, p. 113-238, 2013.

VON WINTERSDORFF, C. J. H.; PENDERS, J.; VAN NIEKERK, J. M.; MILLS, N. D.; MAJUMDER, S.; VAN ALPHEN, L. B.; SVELKOU, P. H. M.; WOLFFS, P. F. G. Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. **Frontiers in Microbiology**. V. 7: 173, 2016.