Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Nazareth Magnago Klein

Estudo genômico e fenotípico, que inclui a abordagem de perfis proteômicos por MALDI-TOF MS, de isolados de hemoculturas para o estabelecimento de uma coleção de bactérias de referência

novembro de 2014

Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Nazareth Magnago Klein

Estudo genômico e fenotípico, que inclui a abordagem de perfis proteômicos por MALDI-TOF MS, de isolados de hemoculturas para o estabelecimento de uma coleção de bactérias de referência

Tese de Doutoramento Engenharia Química e Biológica

Trabalho realizado sob a orientação do
Doutor Cledir Santos
Investigador Auxiliar
Centro de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, Braga

e co-orientação da
Doutora Marise Dutra Asensi
Pesquisadora Titular
Departamento de Bacteriologia, Fundação Oswaldo Cruz,
Ministério da Saúde, Brasil

novembro de 2014

Autor: Nazareth Magnago Klein

Estudo genômico e fenotípico, que inclui a abordagem de perfis proteômicos por MALDI-TOF MS, de isolados de hemoculturas para o estabelecimento de uma coleção de bactérias de referência.

Orientador: Doutor Cledir Santos
Co-orientadora: Doutora Marise Dutra Asensi
Email: nmklein@hucam.ufes.br
Ano de conclusão: 2014
Doutoramento em Engenharia Química e Biológica

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE APENAS PARA EFEITO DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE;
Universidade do Minho, 26 / 11 / 2014

Assinatura:



DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

Declaro ter atuado com integridade na elaboração da presente tese. Confirmo que em todo o trabalho conducente à sua elaboração não recorri à prática de plágio ou a qualquer forma de falsificação de resultados. Mais declaro que tomei conhecimento integral do Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

Universidade do Minho, 26 de novembro de 2014.

Nome completo: Nazareth Magnago Klein

Assinatura: 

A simplicidade é o que há de mais difícil no mundo, é o extremo da experiência e o último fruto do gênio, portanto, é o último degrau da sabedoria.

"O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano" (Isaac Newton)

Agradecimentos

A Deus, pelas maravilhosas oportunidades da vida.

A minha família, em especial meu pai Napoleão e minha mãe Edna, por compreenderem meu cansaço, minha falta de tempo e atenção. A minha amada irmã Ednalva pelas suas palavras de apoio e meu amado irmão Edmar pela grande contribuição na formatação deste trabalho. A Kessia e Kellen pelo apoio. Ao meu amor, minha filha Gabriela.

Ao meu orientador Dr. Cledir Santos, muito obrigada pela oportunidade, confiança e partilha de conhecimentos essenciais a execução deste trabalho.

A Dra. Marise Dutra Asensi e a todos os colegas da Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil, que me ajudaram a realizar uma parte desta pesquisa.

Ao diretor da Micoteca da Universidade do Minho, Braga-Portugal, Prof. Dr. Nelson Lima, pela excelente oportunidade de aprendizado podendo participar de sua equipe, pelo apoio e disposição em ajudar no que fosse necessário.

Aos meus queridos colegas da Micoteca da Universidade do Minho e Departamento de Engenharia Biológica pela amizade e atenção dispensada: Dra. Marta Simões, Dra.Cristiane Ottoni, Dra. Marília Maciel, Dra. Nicolina Dias, Dra Célia Soares e Leonel Pereira.

Aos colegas e chefia do Laboratório do HUCAM em especial Edna Liberato, Cláudia Valéria e Geilza Gomes, que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Ricardo Pinto Schuenck pela sua disponibilidade, atenção e confiança, quando precisei de seus conhecimentos e do Laboratório de Biologia Molecular e Virulência Bacteriana do Departamento de Patologia, no Centro de Ciências da Saúde da UFES, Vitória-ES, Brasil.

Ao diretor do Laboratório Landsteiner Dr. Sílvio Bonelli e colegas, por todo apoio e compreensão em momentos de ausência no gerenciamento do setor da microbiogia.

A todas as pessoas queridas que tanto me ajudaram e continuam ajudando e que mesmo sem citar nomes, sabem quanto são importantes para mim.

x

Resumo

O presente estudo teve como objetivo estabelecer um acervo de bactérias a partir da coleta de sangue de infecções da corrente sanguínea, através do isolamento, identificação, caracterização e preservação desses microrganismos. Foram realizados diferentes testes: MALDI-TOF MS, técnicas manuais convencionais, VITEK®2 e estudos genéticos. Os genes codificadores de resistência foram detectados por PCR e a análise do polimorfismo genético através do PFGE. As hemoculturas (n=3.214) foram incubadas no Bactec 9240 no período de janeiro a dezembro de 2011 e selecionadas 282 bactérias que foram analisadas de 257 pacientes. Bacilos Gram-Negativos representaram 38% (n=107) e os cocos Gram-Positivos 62% (n=175). Os patógenos foram *K. pneumoniae* (n=33, 12%), *E. coli* (n=33, 12%), *A. baumannii* (n=22, 8%), *P. aeruginosa* (n=19, 7%), *S. aureus* (n=88, 30%), *S. epidermidis* (n=56, 20%) e *Enterococcus* spp. (n=31, 11%). A susceptibilidade antimicrobiana foi determinada pelo VITEK®2 *Systems* e Etest. Além disso, todas as amostras selecionadas foram analisadas por MALDI-TOF MS para a identificação bacteriana. Os resultados finais apontam um elevado nível de precisão (96%) entre os resultados de MALDI-TOF MS e os resultados obtidos a partir de diferentes técnicas descritas acima. A presença de genes de resistência foi realizada por PCR para genes de carbapenemases (*bla*$_{KPC}$, *bla*$_{OXA-48}$, *bla*$_{NDM}$, *bla*$_{SPM,}$ *bla* $_{IMP,}$ *bla* $_{VIM}$, *bla*$_{OXA-23}$, *bla*$_{OXA-24,}$ *bla*$_{OXA-51,}$ *bla*$_{OXA-58,}$ *bla*$_{OXA-143}$) genes de ESBL (*bla*$_{TEM}$, *bla*$_{SHV}$, *bla*$_{CTX-M}$, *bla*$_{CTX-M-15}$), gene de resistência a meticilina (*mec*A*)* e resistência a vancomicina (*van*A, *van*B, *van*C). O gene *bla*$_{TEM}$ foi o mais prevalente em ESBL (58%), seguido por *bla*$_{CTX-M}$ (42%) e *bla*$_{SHV}$ (25%) detectado em Enterobacteriaceae , enquanto que os genes *bla*$_{VIM}$ e *bla*$_{KPC}$ foram observados em apenas 2 linhagens de *K. pneumoniae.* Não foi detectado em *P. aeruginosa* atividade das carbapenemases. O gene *bla*$_{OXA-23}$ foi encontrada em 92% (11/12) das linhagens de *A. baumannii* e *bla*$_{OXA-58}$ em apenas uma. Observou-se 100% do gene *van*A em *E. faecium* VRE (n =12) e 100% do gene *vanC* em *E. gallinarium*. A presença do gene *mecA* que é normalmente encontrado em MRSA observou-se em 90% (35/39) das linhagens. Através do PFGE, foi observada grande diversidade clonal entre as linhagens. As linhagens bacterianas estudadas no âmbito do presente trabalho foram preservadas, garantindo sua sobrevivência, estabilidade e pureza, dando início a uma coleção de culturas, pelo estabelecimento da CCBR-HUCAM, que representa um enorme avanço na área de infraestrutura de apoio à pesquisa do HUCAM. A CCBR-HUCAM alberga neste momento uma parte da biodiversidade genética recorrente nos casos clínicos diagnosticados no HUCAM, sendo uma fonte vital de microrganismos de referência para investigações futuras.

Palavras chave: Infecções da corrente sanguínea, MALDI-TOF MS, Coleções de Culturas.

Abstract

The aim of the present study was to obtain a collection of bacteria from the blood cultures recovered of bloodstream infections, through isolation, characterization, identification and preservation of these microorganisms. For it, different tests were performed: MALDI-TOF MS, classical phenotypical analyses, VITEK®2 and genetic studies. The genes encoding resistance were detected by PCR and the analysis of genetic polymorphism by PFGE. The blood cultures (n=3.214) were incubated in the Bactec 9240 from January to December 2011 and selected 282 bacterial that were analysed of 257 patients. Gram-Negative bacilli represented 38% (n=107) and Gram-Positive cocci 62% (n=175). The pathogens were *K. pneumoniae* (n=33, 12%), *E. coli* (n=33, 12%), *A. baumannii* (n=22, 8%), *P. aeruginosa* (n=19, 7%), *S. aureus* (n=88, 30%), *S. epidermidis* (n=56, 20%) and *Enterococcus* spp. (n=31, 11%). Antibiotic susceptibility was determined by VITEK®2 *Systems* and Etest. Moreover, all of the selected isolates were analysed by MALDI-TOF MS for the bacterial identification. The final results point out to a high level of accuracy (96%) between MALDI-TOF MS results and those results obtained from different techniques described above. The presence of resistance genes was performed by PCR for carbapenemase genes (*bla*$_{KPC}$, *bla*$_{OXA-48}$, *bla*$_{NDM}$, *bla*$_{SPM}$, *bla* $_{IMP}$, *bla* $_{VIM}$, *bla*$_{OXA-23}$, *bla*$_{OXA-24}$, *bla*$_{OXA-51}$, *bla*$_{OXA-58}$, *bla*$_{OXA-143}$) ESBL genes (*bla*$_{TEM}$, *bla*$_{SHV}$, *bla*$_{CTX-M}$, *bla*$_{CTX-M-15}$) methicillin resistance gene (*mec*A) and resistance to vancomycin gene (*van*A, *van*B, *van*C). The *bla*$_{TEM}$ was the most prevalent ESBL gene (58%) followed by *bla*$_{CTX-M}$ (42%) and *bla*$_{SHV}$ (25%), detected in *Enterobacteriaceae* whereas *bla*$_{VIM}$ and *bla*$_{KPC}$ genes were observed in only two strains of *K pneumoniae.* Carbapenemase activity was not detected in *P. aeruginosa.*The *bla*$_{OXA-23}$ gene was found in 92% (11/12) of the *A. baumannii* strains and *bla*$_{OXA-58}$ in only one of the strains. We observed 100% of *van*A gene in *E. faecium* VRE (n=12) and 100% of *vanC* gene in *E. gallinarium*. The presence *mecA* gene which are usually found in MRSA we observed in 90% (35/39) of the strains. By PFGE, clonal diversity was observed among strains. The studied species in the present work were preserved ensuring their survival, stability and purity, starting a collection of culture. The establishment of CCBR-HUCAM represents a huge breakthrough in the HUCAM research area. CCBR-HUCAM has currently part of genetic biodiversity recovered from clinical cases of HUCAM and became an important microbial resource infrastructure for future investigations.

Keywords: Bloodstream infections, MALDI-TOF MS, Culture Collections.

Lista de abreviaturas e siglas

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ANT(s)	Antimicrobiano(s)
BGN	Bacilo Gram-Negativo
BGN-F	Bacilo Gram-Negativo fermentador
BGN-NF	Bacilo Gram-Negativo não-fermentador
bla	Gene beta-lactamase
CC	Coleção de Culturas
CCs	Coleções de Culturas
CCIH	Comissão de Controle de Infecção Hospitalar
CHCA	Ácido α-ciano-4-hidroxi-cinâmico
CM	Clínica Médica
CTI	Centro de Terapia Intensiva
CTX-M	Beta-lactamase Cefotaximase
DNA	Acido Desoxirribonucléico
dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
DHB	Ácido 2,5-di-hidróxi-benzóico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
ESBL	Beta-lactamases de Espectro Estendido
EUA	Estados Unidos da América
et al	e colaboradores
GN	Gram-Negativos
GP	Gram-Positivos
HUCAM	Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes
HCl	Ácido Clorídrico
ICS	Infecções de Corrente Sanguínea
IMP	do inglês *Imipenemase*
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
KPC	*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase
Kb	Kilobase
KV	Quilovolt
MALDI-TOF MS	do inglês *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time Of Flight Mass Spectrometry*
MBL	Metalo beta-lactamase
MDR	do inglês *Multi Drug Resistance*
MgCl2	Cloreto de Magnésio

MYSTIC	do inglês *Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection*
MPA	Ácido 2-mercaptopropiônico
MSSA	do inglês *Methicillin susceptible Staphylococcus aureus*
MRSA	do inglês *Methicilin resistant Staphylococcus aureus*
m/z	Massa/carga
ns	Nanosegundo
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NDM	*New Delli* Melalo beta-lactamase
OXA	Oxacilinases
PBP	do inglês *Penicilin Bind Protein*
pb	Pares de base
PCR	do inglês *Polymerase Chain Reaction*
PFGE	do inglês *Pulsed Field Gel Eletrophoresis*
pH	Potencial Hidrogeniônico
PS	Pronto Socorro
PYR	do inglês *Pyrrolidonyl arylamidase test*
RNAr	Ácido Ribonucléico Ribossômico
rpm	Rotação por minuto
SCN	*Staphylococcus* coagulase negativo
SENTRY	do inglês *Antimicrobial Surveillance Program*
SPM	São Paulo Metalo-beta-lactamases
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SHV	do inglês *Beta-lactamase Sulfhydryl variable*
ST	do inglês *Sequence Type*
TE	Tampão Tris-EDTA
TEM	Beta-lactamase Temoneira
TBE	Tampão Tris + Ácido Borônico + EDTA
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
TSA	Teste de susceptibilidade a antimicrobiano
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
VIM	do inglês *Verona Imipenemase*
VRE	Enterococos resistente a vancomicina
WFCC	do inglês *World Federation for Culture Collections*

Lista de Figuras

Figura 1 - Cartões de identificação GP VITEK®2 para bactérias Gram-positivas e GN VITEK®2 para bactérias Gram-Negativas (bioMérieux) 67
Figura 2 - Cartões de TSA para Gram-Positivo AST-P585 e Gram-Negativo AST-N105 (bioMérieux) 71
Figura 3 - Determinação da CIMs de vancomicina e daptomicina por Etest e o teste *screnning* com cefoxitina para *S. aureus* em ICS. 72
Figura 4 - Teste de aproximação em discos de uma linhagem de *Klebsiella pneumoniae* para confirmação do fenótipo de ESBL. 74
Figura 5 - Distorção do halo de inibição que é indicativa de carbapenemase pela amostra de *Klebsiella pneumoniae* testada 75
Figura 6 - Teste fenotípico positivo da produção de metalo beta-lactamases 76
Figura 7 - Gel representativo da detecção enzima carbapenemase do tipo KPC e NDM, após PCR tipo Multiplex, em *K. pneumoniae*. 112
Figura 8 - Gel representativo da detecção das enzimas oxalicinases após PCR, em *Acinetobacter baumannii*. 113
Figura 9 - Gel representativo da detecção das enzimas oxalicinases após PCR, em *Acinetobacter baumannii*. 114
Figura 10 - Gel representativo dos amplicons do gene mecA nas linhagens de MRSA..... 115
Figura 11 - Gel representativo da tipagem molecular por PFGE, em linhagens de *Acinetobacter baumannii* resistentes e sensíveis a carbapenêmicos. 116
Figura 12 - Dendrograma dos perfis de fragmentação de DNA cromossomal encontrados em *Acinetobacter baumannii* (n=19), obtidos pela eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)..... 117
Figura 13 - Dendrograma dos perfis de fragmentação de DNA cromossomal encontrados nas 12 linhagens de *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenêmicos, obtidos pela eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)..... 118
Figura 14 - Dendrograma dos perfis de fragmentação de DNA cromossomal encontrados nas 2 linhagens de *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenêmicos, obtidos pela eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)..... 118
Figura 15 - Dendrograma dos perfis de fragmentação de DNA cromossomal encontrados em *K. pneumoniae* (n=26), obtidos pela eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE).. 119
Figura 16 - Dendrograma dos perfis de fragmentação de DNA cromossomal encontrados em *K. pneumoniae* (n=17), produtoras de ESBL, obtidos pela eletroforese e em gel de campo pulsado (PFGE)..... 120

Figura 17 – Dendrograma dos perfis de fragmentação de DNA cromossomal encontrados em *K. pneumoniae* (n=3), produtoras das enzimas CTX-M-15, obtidos pela eletroforese e em gel de campo pulsado (PFGE). 121
Figura 18 - Dendrograma dos perfis de fragmentação de DNA cromossomal encontrados em *E. coli* (n=11), obtidos pela eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). 121
Figura 19 - Gel representativo da tipagem molecular por PFGE, em *E. coli* (EC31,EC32 e EC203)..... 122
Figura 20 - Dendrograma dos perfis de fragmentação de DNA cromossomal encontrados em *E. coli* produtoras de ESBL, obtidos pela eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). 122
Figura 21 - Dendrograma dos perfis de fragmentação de DNA cromossomal encontrado em 2 linhagens de *E. coli,* obtidos pela eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). 123
Figura 22 - Dendrograma dos perfis de fragmentação de DNA cromossomal encontrados em *P. aeruginosa* (n=6), obtidos pela eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)..... 123
Figura 23 - Dendrograma dos perfis de fragmentação de DNA cromossomal encontrados em *P. aeruginosa* (n=2), obtidos pela eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)..... 124

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Características fenotípicas para a identificação de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. 69
Tabela 2 - Características fenotípicas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. 70
Tabela 3 - Características fenotípicas da identificação das espécies de *Enterococcus* spp. 70
Tabela 4 - Iniciadores e condições específicas das reações de PCR para detecção dos genes codificadores de resistência a carbapenêmicos em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. 82
Tabela 5 - Iniciadores e condições específicas das reações de PCR para detecção dos genes codificadores de ESBLs em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. 83
Tabela 6 - Iniciadores e condições específicas das reações de PCR Multiplex, para detecção dos genes de resistência codificadores de Oxacilinases em *Acinetobacter baumannii*. 84
Tabela 7 - Iniciadores e condições específicas das reações de PCR para detecção dos genes codificadores de resistência a carbapenêmicos em *Pseudomonas aeruginosa*. 85
Tabela 8 - Iniciadores e condições específicas das reações de PCR para detecção dos genes de resistência nos Cocos Gram-Positivos: *S. aureus, E. faecium* e *E. gallinarium*. .. 86
Tabela 9 - Número de *E. coli* e *K. pneumoniae* isoladas nos setores do HUCAM. 96
Tabela 10 - Número de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* isoladas nos setores do HUCAM. ... 96
Tabela 11 - Número de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Enterococcus* spp. isolados nos setores do HUCAM. 97
Tabela 12 - Período de isolamento e distribuição ao longo dos meses de 2011 das 282 linhagens bacterianas avaliadas neste estudo. 99
Tabela 13 - Frequência e distribuição da CIM para Imipenem e Meropenem em *Acinetobacter baumannii* sensíveis aos carbapenêmicos (n=10). 104
Tabela 14 - Frequência e distribuição da CMI para Imipenem e Meropenem em *Pseudomonas aeruginosa* sensíveis aos carbapenêmicos (n=15). 104
Tabela 15 - CMI e susceptibilidade aos antimicrobianos beta-lactâmicos em *Escherichia coli,* produtoras de ESBL (n=7). 105
Tabela 16 - CMIs e susceptibilidade aos antimicrobianos beta-lactâmicos em *Klebsiella pneumoniae,* produtoras de ESBL (n=17). 107
Tabela 17 - Percentual de frequência dos genes bla_{SHV}, bla_{TEM}, bla_{CTX-M} e a variante alélica $bla_{CTX-M-15}$ em linhagens *K. pneumoniae* e *E. coli* produtoras de ESBL. 108
Tabela 18 - Percentual de frequência dos genes codificadores de ESBLs em *Klebsiella pneumoniae*. 109

Tabela 19 - Percentual de associação dos genes de beta-lactamases detectados em *Klebsiella pneumoniae*, produtoras de ESBL pelo teste fenotípico (n=17). 110
Tabela 20 - Percentual de frequência dos genes codificadores de ESBLs em *Escherichia coli*. 111
Tabela 21 - Percentual de associação dos genes de beta- lactamases detectados em *Escherichia coli,* produtoras de ESBL, pelo teste fenotípico (n=7). 111
Tabela 22 - Comparação dos resultados obtidos pelo sistema VITEK®2 e MALDI-TOF MS, na identificação de 282 linhagens bacterianas. 125

Lista de Esquemas

Esquema 1 - Representação esquemática do fluxo de trabalho em hemocultura. 65
Esquema 2 - Representação esquemática do fluxo de trabalho da identificação bacteriana automatizada com o sistema automatizado VITEK®2 Systems 66
Esquema 3 - Representação esquemática da identificação fenotípica convencional dos Cocos Gram-Positivos. 68
Esquema 4 - Representação esquemática da identificação fenotípica convencional dos Bacilos Gram-Negativos fermentadores e não fermentadores. 68
Esquema 5 - Passos da identificação polifásica das linhagens bacterianas realizada na criação da CCBR-HUCAM. 91

Lista de Gráficos

Gráfico 1 - Distribuição por espécie das 282 linhagens bacterianas isoladas de hemocultura e selecionadas neste estudo. 93
Gráfico 2 - Número total das linhagens de Bacilos Gram-Negativos selecionados neste estudo e resistência a antimicrobianos, isoladas de hemocultura. 94
Gráfico 3 - Número total das linhagens de Cocos Gram-Positivos selecionados neste estudo e resistência a antimicrobianos, isoladas de hemocultura. 95
Gráfico 4 - Percentual das linhagens bacterianas que apresentaram resistência relevante (R*), em setores importantes do HUCAM. 98
Gráfico 5 - Percentual de resistência aos antimicrobianos dos Bacilos Gram-Negativos não fermentadores. 101
Gráfico 6 - Perfil de resistência aos antimicrobianos em 14 amostras de *E. faecium.* 103

Sumário

Capítulo 1. Introdução Geral 1
1.2. Objetivos 3
1.3. Estrutura da tese 4
Capítulo 2. Revisão da Literatura 7
2.1. Infecções de corrente sanguínea 7
2.1.1. Infecções relacionadas à assistência à saúde 7
2.2. Linhagens bacterianas envolvidas neste estudo 8
2.2.1. *Escherichia coli:* Características gerais 9
2.2.2. *Klebsiella pneumoniae:* Características gerais 9
2.2.3. *Pseudomonas aeruginosa:* Características gerais 10
2.2.4. *Acinetobacter baumannii:* Características gerais 10
2.2.5. *Staphylococcus spp:* Características gerais 10
2.2.6. *Enterococcus* spp.: Características gerais 11
2.3. Linhagens bacterianas frequentemente isoladas em ICS 11
2.4. Taxas de mortalidade em infecções de corrente sanguínea 14
2.4.1. Tratamento empírico 15
2.5. Resistência aos antimicrobianos 16
2.5.1. Antimicrobianos 16
2.5.2. Importância da resistência bacteriana 17
2.5.3. Resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos 18
2.5.3.1. Produção de beta-lactamases 18
2.5.3.1.1. Beta-Lactamases de Espectro Estendido 19
2.5.3.1.2. Carbapenemases 21
2.5.3.1.2.1. Carbapenemases Classe A- KPC 22
2.5.3.1.2.2. Carbapenemases da classe B- Metalo-beta-lactamases 23
2.5.3.1.2.3. Carbapenemases de classe D- Oxacilinases 24
2.5.3.2. Considerações finais da resistência por beta-lactamases 25
2.6. Importância clínica e epidemiologia das linhagens bacterianas deste estudo 25
2.6.1. Enterobactérias: *E.coli* e *K. pneumoniae* 25
2.6.2. *Acinetobacter baumannii* 26
2.6.2.1. Resistência a carbapênemicos em *A. baumannii* 27
2.6.3. *Pseudomonas aeruginosa* 28
2.6.3.1. Resistência a carbapnêmicos em *Pseudomonas aeruginosa* 28
2.6.4. *Staphylococcus* spp. 30
2.6.4.1. Resistência a meticilina/oxacilina em *Staphylococcus aureus* 30
2.6.5. *Enterococcus* spp 31

2.6.5.1. Importância dos *Enterococcus* spp. resistentes a vancomicina 31
2.7. Identificação bacteriana 33
2.7.1. Métodos fenotípicos convencionais 34
2.7.2. Identificação bacteriana automatizada por VITEK®2 *Systems* 34
2.7.3. Identificação bacteriana por MALDI-TOF MS 35
2.7.3.1. Descrição técnica 35
2.7.3.2. Importância da *i*dentificação por MALDI-TOF MS 39
2.7.3.3. Detecção da resistência antimicrobiana por MALDI-TOF MS 42
2.7.3.4. Outras aplicações em microbiologia clínica 45
2.7.3.5. Considerações finais da técnica MALDI-TOF MS 46
2.8. Metodologias moleculares 48
2.8.1. Detecção dos genes codificadores de resistência através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) 48
2.8.2. Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) 48
2.9. Coleção de culturas 49
2.9.1. Curador da coleção de cultura 51
2.9.2. Preservação de microrganismos 51
2.9.2.1. Preservação a médio prazo 52
2.9.2.1.1. Congelamento comum 52
2.9.2.2. Preservação a longo prazo 52
2.9.2.2.1. Criopreservação 52
2.9.2.2.1.1. Danos decorrentes do processo 53
2.9.2.2.1.2. Agentes conservantes para criopreservação 54
2.9.2.2.2. Liofilização 55
2.9.3. Considerações finais da preservação das coleções de cultura 55
2.9.4. Informação dos dados referente as coleções de cultura 56
2.9.5. Coleções biológicas brasileiras 57
2.9.6. Colaboração nacional e internacional 59
2.9.7. Coleções de microrganismos (*ex situ*) internacionais 61
2.9.8. Controle de qualidade das coleções de cultura 61
2.9.9. Considerações finais das coleções de cultura 61
Capítulo 3. Materiais e Métodos 63
3.1. Linhagens bacterianas 63
3.1.1. Seleção das Linhagens 63
3.1.2. Estocagem das amostras 63
3.2. Isolamento, identificação e teste de susceptibilidade aos antimicrobianos (TSA) das linhagens bacterianas 63

3.2.1. Assepsia da pele e coleta do sangue 63
3.2.2. Volume do sangue e número de amostras 64
3.2.3. Incubação das hemoculturas 64
3.2.4. Positividade das hemoculturas 64
3.2.5. Coloração de Gram 64
3.2.6. Meios de cultura utilizados 64
3.2.7. Incubação dos inóculos 65
3.2.8. Identificação automatizada 66
3.2.9. Identificação fenotípica convencional 67
3.2.9.1. Bacilos Gram-Negativos 69
3.2.9.1.1. Bacilos Gram-Negativos fermentadores 69
3.2.9.1.2. Bacilos Gram-Negativos não fermentadores 69
3.2.9.2. Cocos Gram-Positivos 70
3.2.10. Testes de susceptibilidade a antimicrobianos (TSA) 70
3.2.10.1. Teste de difusão em ágar 72
3.2.10.2. Determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) de imipenem, meropenem, ertapenem, polimixina B e tigeciclina 73
3.3. Controle de Qualidade 73
3.3.1. Periodicidade 73
3.3.2. Linhagens bacterianas utilizadas 73
3.3.2.1. Meios de cultura utilizados e leitura 73
3.3.3. Testes fenotípicos para a detecção dos genes de resistência em Bacilos Gram-Negativos 74
3.3.3.1. Detecção fenotípica de ESBL *(Extended spectrum beta-lactamase)* 74
3.3.3.2. Teste de Hodge modificado 74
3.3.3.3. Teste fenotípico para detecção da produção de metalo beta-lactamases 75
3.3.3.3.1. Método de disco aproximação para detecção da produção de MBLs. 76
3.3.3.3.2. Método de disco combinado para detecção da produção de MBLs 76
3.3.4. Teste fenotípico para a detecção de resistência a oxacilina em *Staphylococcus* spp. 77
3.3.5. Testes fenotípicos para a detecção de resistência a vancomicina em *Enterococcus* spp. 77
3.4. Testes genotípicos 77
3.4.1. Detecção de genes de resistência pela técnica de PCR 77
3.4.1.1. Extração do DNA bacteriano 78
3.4.1.2. Reação de amplificação dos genes de resistência 78
3.4.1.3. Eletroforese em gel de agarose e fotodocumentação 81

3.4.2. Estudo da diversidade genética através de técnica de análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico após PFGE 87
3.5. Análise dos perfis proteômicos por MALDI-TOF MS 89
3.5.6. Classificação dos microrganismos por MALDI-TOF MS 90
3.6. Estabelecimento da Coleção de Culturas de Bactérias de Referência do HUCAM ... 90
3.6.1. Meio de cultura utilizado para armazenamento 90
3.6.2. Método de preservação 90
3.6.3. Cadastro e armazenamento dos dados 91
Capítulo 4. Resultados e Discussão 93
4.1. Linhagens bacterianas 93
4.2. Setores hospitalar 95
4.3. Período de isolamento das linhagens bacterianas 98
4.4. Detecção fenotípica de possíveis mecanismos de resistência nos BGN 99
4.4.1. Detecção fenotípica de ESBL 99
4.4.2. Teste de Hodge modificado 99
4.4.3. Detecção presuntiva da produção de MBLs 100
4.4.4. Teste fenotípico com cefoxitina para detecção da resistência a oxacilina. 100
4.5. Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos (TSA) 100
4.6. Determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) 103
4.7. Detecção de genes de resistência por PCR 108
4.7.1. Detecção genotípica dos genes codificadores de ESBLs em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* 108
4.7.2. Detecção genotípica dos genes codificadores de resistência a carbapenêmicos em *Klebsiella pneumoniae* 111
4.7.3. Detecção genotípica dos genes codificadores de resistência a carbapenêmicos em *Pseudomonas aeruginosa* 112
4.7.4. Detecção genotípica dos genes de resistência codificadores de Oxacilinases em *Acinetobacter baumannii* 113
4.7.5. Detecção genotípica dos gene codificador de resistência a oxacilina em *Staphylococcus aureus* 114
4.7.6. Detecção genotípica dos genes de resistência a vancomicina em cocos Gram-Positivos 115
4.8. Determinação do polimorfismo genético por PFGE 115
4.9. Análise dos perfis proteômicos por MALDI-TOF MS 124
4.10. Discussão 126
Capítulo 5. Conclusões 155
Cápitulo 6. Referências Bibliográficas 157

Capítulo 1. Introdução Geral

1.1. Considerações Gerais

As infecções de corrente sanguínea (ICS) têm grande relevância no diagnóstico, pois frequentemente estão associadas à taxas significantes de morbidade e mortalidade, representam uma das mais significativas complicações no processo infeccioso e podem ocorrer em pacientes imunocompetentes ou imunocomprometidos. Sendo assim, a cultura do sangue (hemocultura), é um exame de importante valor preditivo de infecção. Consequentemente, o laboratório de microbiologia tem um papel importante na análise de amostras de sangue dos pacientes com bacteremia, principalmente quando o verdadeiro patógeno e/ou a susceptibilidade aos antimicrobianos desviam-se do previsto pelo clínico.

Devido ao uso descontrolado de antimicrobianos e da administração empírica, vários problemas de resistência microbiana surgiram como um novo desafio para a terapêutica, causando elevados índices de mortalidade. Dentre os grupos de microrganismos relacionados a infecções resistentes destacam-se: *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* resistentes aos carbapenêmicos, *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, *Enterococcus* spp. resistentes a vancomicina e a diferentes classes de antimicrobianos, bem como as enterobactérias produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (*extended-spectrum β-lactamase)* conhecidas como ESBL.

Devido ao fato de ICS permanecer como causa importante de morbidade e mortalidade, tem sido grande a busca pela terapia adequada e o interesse em implementar métodos de cultura do sangue que sejam rápidos e de boa qualidade. Apesar destes esforços, pequena mudança ocorreu na detecção de positividade dos cultivos, desde a introdução dos sistemas de monitoramento contínuo para hemoculturas. Porém, grandes avanços têm ocorrido especialmente na identificação mais rápida e precisa dos microrganismos.

Os métodos microbiológicos tradicionais não automatizados, para identificação da maioria dos agentes infecciosos, baseiam-se na análise fenotípica do perfil metabólico do microrganismo, frente a diversas provas bioquímicas. Na prática rotineira de um laboratório de microbiologia clínica, a utilização dos meios a serem utilizados fica a critério do bacteriologista, possibilitando a identificação da maioria das espécies isoladas dos materiais clínicos, salvo espécies atípicas ou raras. Algumas bactérias podem oferecer dificuldades em etapas de identificação, não proporcionando respostas satisfatórias nos meios de identificação propostos. Estas limitações exigem técnicas automatizadas e/ou métodos moleculares que são caros, exigem aparelhos específicos e mão de obra qualificada.

O sistema automatizado VITEK®2, compara o conjunto de reações obtidas no teste, com o conjunto de reações típicas esperadas para o microrganismo, gerando um percentual de probabilidade. Mesmo com a utilização dos diferentes sistemas automatizados existentes no mercado, o resultado final da identificação do agente etiológico das ICS, leva na maioria dos casos 12h, podendo chegar a dias em algumas situações específicas, quando se faz necessárias provas adicionais. Caso contrário, erros de identificação podem ocorrer. Estas técnicas bioquímicas, são consumidoras de tempo, estão associadas a altos custos e dependem de profissionais experientes. Os resultados obtidos, muitas vezes, perdem o impacto clínico e atrasam a terapia antimicrobiana adequada ao tratamento do paciente, aumentando o risco de mortalidade.

Porém, com o desenvolvimento crescente na instrumentação analítica, a espectrometria de massas vem se destacando. A técnica de Ionização/Dessorção de Matriz Assistida por Laser (MALDI), combinada a espectrometria de massas com o sistema de separação por tempo de voo (TOF/MS), é uma técnica de espectrometria de massas por ionização suave de moléculas biológicas. Este sistema surge como uma ferramenta robusta para a identificação fenotípica de microrganismos. O MALDI-TOF MS analisa as proteínas constituinte da parede celular e as proteínas ribossomais, aumentando a confiabilidade frente a outras técnicas fenotípicas. O espectro gerado é interpretado como “impressões digitais” de um taxon específico, discriminando espécies de microrganismos estreitamente relacionadas. Esta metodologia tem-se mostrado de grande relevância para a investigação em microbiologia clínica, por se tratar de uma técnica rápida, econômica e eficaz.

Métodos moleculares como a amplificação de segmentos do DNA empregando a reação em cadeia da polimerase (PCR- *Polymerase Chain Reaction*) para identificarmos o gene codificador de resistência e principalmente a análise dos perfis de fragmentação do DNA após digestão com enzimas de restrição e eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE- *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*) são recomendados para a tipagem de microrganismos com propósitos epidemiológicos. Esses métodos genotípicos demonstram que a produção de enzimas codificadoras de resistência pode não está restrita a uma única linhagem clonal e que tal característica pode ser disseminada para outros grupos clonais.

O Laboratório de Microbiologia Clínica do Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes - HUCAM, da Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, realiza o diagnóstico das infecções bacterianas, contribuindo com a Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH), no controle de microrganismos multi resistentes (MDR) e a terapia adequada dos pacientes.

Devido o interesse constante de pesquisa sobre esses patógenos, bem como sobre a diversidade bacteriana isolada de amostras clínicas, é de vital importância a criação de uma Coleção de Culturas para: (1)preservar os recursos microbiológicos relacionados com

a epidemiologia de importantes patógenos regionais, com o intuito de possíveis estudos comparativos entre diferentes regiões do país e de outros países; (2) fornecer linhagens bacterianas clínicas para a UFES para o desenvolvimento de estudos ligados a diferentes cursos; (3) estimular a pesquisa para desenvolvimento biotecnológico em saúde; (4) estabelecer um vínculo entre profissionais da mesma área de diagnóstico, professores de ensino e com organizações envolvidas com coleções de culturas de outros países e (5) incentivar o estudo dos processos de isolamento, cultivo, caracterização, preservação e distribuição dos microrganismos.

1.2. Objetivos

O objetivo principal desta tese foi estabelecer uma coleção de culturas de bactérias de referência no HUCAM para a preservação de recursos microbiológicos provenientes de amostras clínicas de hemoculturas, nas análises de rotina no período de janeiro a dezembro de 2011, no HUCAM, identificados pelo sistema automatizado VITEK®2, por MALDI-TOF MS, e analisados por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e PFGE (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*) quanto aos seus perfis de resistência às principais classes de antimicrobianos.

Neste contexto, os objetivos específicos da presente tese foram:

- Isolar, realizar a identificação bacteriana com testes de susceptibilidade aos antimicrobianos, utilizando o sistema automatizado VITEK®2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) e métodos bioquímicos convencionais, para um conjunto de bactérias Gram-Positivas e Gram-Negativas, representadas por *Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium e Enterococcus gallinarium,* isoladas de hemoculturas, na rotina do laboratório de microbiologia, no período de janeiro a dezembro de 2011, de pacientes internados no HUCAM:

- Determinar, através do método de PCR, os principais mecanismos de resistência relacionados com as linhagens bacterianas multiresistentes;

- Determinar os genótipos por PFGE das linhagens bacterianas multiresistentes, bem como as susceptíveis às principais classes de antimicrobianos;

- Comparar a eficácia da técnica de MALDI-TOF MS com o sistema automatizado VITEK®2;

- Estabelecer uma coleção de culturas para preservar as linhagens bacterianas avaliadas neste trabalho e outras a serem isoladas no futuro, de modo que essa coleção seja referência para os trabalhos desenvolvidos no HUCAM.

1.3. Estrutura da tese

Esta tese está organizada em 6 capítulos.

O capítulo 1 apresenta as considerações gerais, nos quais se encontra a justificativa e motivação para a realização deste estudo. Em decorrência disto, foram traçados objetivos que conduziram o desenvolvimento dos testes.

O capítulo 2, apresenta a revisão da literatura, descrevendo os fundamentos teóricos relacionados a abordagem desta pesquisa. Este capítulo inicia-se descrevendo a importância de diagnóstico rápido em ICS, devido as altas taxas de mortalidade, assim como relatos de diferentes autores demonstrando a frequência dos principais patógenos e a susceptibilidade frente a importantes classes de antimicrobianos. Neste contexto, ressalta-se também a importância de estudos direcionados ao reconhecimento das enzimas que codificam os principais genes de resistência produzidos por estes microrganismos, através da biologia molecular, especificamente a reação de PCR, devido a grande emergência de resistência entre os Bacilos Gram-Negativos (BGN) e consequentemente, a sua disseminação, determinando os genótipos por PFGE. Posteriormente, aborda as diferentes metodologias empregadas na identificação dos patógenos, dando maior atenção a por MALDI-TOF MS. São descritos diferentes trabalhos para esta rápida metodologia, destacando-se o seu potencial quando utilizada em um laboratório de microbiologia clínica. Por fim, a importância da criação de uma coleção de cultura científica.

O capítulo 3 descreve os materiais e métodos utilizados para a realização desta pesquisa, sendo descritos os procedimentos realizados na rotina de um laboratório de microbiologia clínica, como a coleta de sangue para realização da hemocultura, o emprego de técnicas bioquímicas convencionais e automatizadas pelo VITEK®, para otimização da identificação bacteriana, teste de susceptibilidade a antimicrobianos (TSA), testes fenotípicos para detecção presuntiva das principais enzimas de resistência atualmente descritas. Além do mais, a realização da análise dos perfis proteômicos das linhagens bacterianas, através da técnica contemporânea de espectrometria de massa, conhecida como MALDI-TOF MS. Posteriormente, foram descritos os estudos moleculares destinados ao reconhecimento da expressão gênica das principais enzimas envolvidas na resistência bacteriana, pela reação de *Polimerase Chain Reaction* (PCR) e estudo da diversidade

genética das linhagens bacterianas, através do método de *Pulsed Field Eletrophoresis* (PFGE). Finalmente o estabelecimento da Coleção de Culturas de Bactérias de Referência do HUCAM (CCBR-HUCAM).

O capítulo 4 apresenta o conjunto dos resultados obtidos com as diferentes metodologias empregadas neste estudo e a comparação com a identificação por MALDI-TOF MS e consequentemente a discussão dos mesmos. Discute também neste capítulo a importância da criação da CCBR-HUCAM.

O capítulo 5 resume as principais conclusões obtidas com este trabalho.

O capítulo 6 contém as referências bibliográficas, que serviram de consulta para o desenvolvimento deste estudo.

Capítulo 2. Revisão da Literatura

2.1. Infecções de corrente sanguínea

A avaliação dos pacientes suspeitos de ICS inclui a hemocultura, na qual uma amostra de sangue do paciente é incubada em meio de cultura apropriada para promover o crescimento do patógeno, levando a identificação do agente etiológico. O significado clínico da hemocultura positiva tem sido avaliado extensivamente por décadas. Esses estudos têm servido para definir as características dos pacientes, os riscos associados à infecção e os agentes mais frequentes responsáveis pelas ICS.

De acordo com os dados da literatura, mais de 70% dos episódios de ICS tiveram sua fonte identificada. O cateter intravenoso, indispensável na prática da medicina moderna, continua sendo a principal fonte da infecção, seguido do trato geniturinário e respiratório. Entre os fatores que predispõe os pacientes de ICS, o cateter venoso central (CVC) foi o mais frequente, responsável por 70,3% das ICS (Marra *et al.,* 2011).

O risco de infecção, relacionado ao acesso vascular, está associado à localização do acesso, solução infundida, experiência do profissional que realiza o procedimento, tempo de permanência, tipo e manipulação do cateter, entre outros. Tais fatores constituem pontos estratégicos importantes para ações preventivas dessas infecções. O tipo de microrganismo envolvido nesse processo e o prognóstico da infecção dependem da competência imunológica e da idade do paciente.

O prolongamento da internação, por si só, favorece o aumento do risco às infecções, a redução da disponibilidade dos leitos e o aumento dos custos hospitalares, entre outros. Embora a incidência de ICS, seja mais baixa que as outras infecções, como infecções do trato urinário, as pneumonias e as do sítio cirúrgico, a ICS tem sua importância por ser causa de substancial morbidade, mortalidade e elevação dos custos hospitalares (Yaw *et al.,* 2014). Um trabalho realizado na Argentina reportou excesso de custo de US$4888 e aumento da duração de internação de 11,9 dias por episódio de ICS, com taxa de mortalidade de 24,6% (Rosenthal *et al.,* 2003). Outro estudo analisando um banco de dados de aproximadamente 58.000 amostras de infecções, onde 21,6% estavam relacionadas a ICS, observou que o custo médio para este tipo de infecção variava entre US$10 mil a US$20 mil por paciente e a taxa de mortalidade foi de 19,5% nos casos associados a cirurgia invasiva (Eber *et al.,* 2010).

2.1.1. Infecções relacionadas à assistência à saúde

Infecções Relacionadas a Assistência a Saúde (IRAS) constituem um grave problema de saúde pública, tanto em países desenvolvidos, quanto naqueles em desenvolvimento. As IRAS podem ser definidas como qualquer infecção adquirida pelos

pacientes em consequência aos cuidados de saúde a ele prestados, dentro ou fora do ambiente hospitalar, sobretudo devido à realização de procedimentos invasivos, da terapêutica antimicrobiana ou imunossupressora e das internações subsequentes.

Os pacientes internados em Centro de Terapia Intensiva (CTI) estão associados com maior risco de desenvolverem IRAS. Neste contexto, a bacteremia (bactérias circulando no sangue), é responsável por um grande número de casos, com 23% de mortalidade atribuída em países desenvolvidos, podendo afetar mais de 52% dos pacientes internados em CTI. A causa principal de mortalidade é a terapia antimicrobiana empírica inapropriada, levando a um risco maior de desenvolverem microrganismos MDR e aumentando os custos relacionados ao paciente (Cortés *et al*., 2010). O tempo médio de internação hospitalar dos pacientes com os diferentes patogenos envolvidos em ICS, variou entre 21 a 22 dias para *Acinetobacter* spp. e *S. aureus,* respectivamente, a 32 dias de *Pseudomonas* spp. e enterococos (Marra *et al.,* 2011). Um estudo realizado no Brasil por Primo e colaboradores com 84 pacientes, mostrou que o gasto com ICS por *S. aureus* foi 6,7 vezes maior quando comparado à pacientes com hemoculturas negativas. Além disso, houve também um aumento de 32,1 dias na permanência hospitalar destes pacientes (Primo *et al.,* 2012).

2.2. Linhagens bacterianas envolvidas neste estudo

As bactérias da família *Enterobacteriaceae*, como *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, tem um destaque importante nas infecções hospitalares e comunitárias, pela sua alta frequência e nas últimas décadas devido a altos índices de resistência a diferentes classes de antimicrobianos (ANTs), sendo consideradas como um dos principais agentes etiológicos dentre os Bacilos Gram-Negativos fermentadores (BGN-F) se tornando um problema de saúde pública (Gales *et al.,* 2012).

As bactérias do grupo dos BGN não fermentadores (BGN-NF) como *Acinetobacter baumanni* e *Pseudomonas aeruginosa,* são considerados microrganismos ubíquos, podendo ser encontrados no solo, na água e até mesmo colonizando a pele ou mucosas de humanos. São patógenos oportunistas que estam frequentemente envolvidos em surtos de infecções em todo o mundo, ocorrendo principalmente em pacientes imuno comprometidos no CTI. Dada a sua competência natural de sobrevivência em reservatórios ambientais e humanos, ao longo dos anos sua evolução foi surpreendente, onde o bombardeio constante de um arsenal de ANT, proporcionou um excelente terreno fértil para o surgimento de linhagens MDR (Carvalho *et al*., 2009).

As bactérias representadas pelos cocos Gram-Positivos (CGP), como o *Stapylococcus. aureus,* que apesar de ser comumente considerado um patógeno nosocomial, onde a internação por longo período sempre foi fator determinante para o

surgimento desta infecção, atualmente são encontrados causando infecções graves também na comunidade (Caraciolo *et al.,* 2012), sobretudo nos casos onde exista uma doença de base grave, como diabetes ou ainda, devido ao uso descontrolado de ANTs.

O *Stapylococcus epidermidis* é considerado como um dos principais causadores de infecções nosocomiais, principalmente em pacientes com fatores pre-disponentes, tais como uso de CVC e/ou dispositivos implantados, devido a formação de biofilme (von Eiff *et al.,* 2002).

Os Enterococos Resistentes a Vancomicina (VRE) representam um grande problema na assistência hospitalar, com dificuldades terapêuticas e de controle ambiental, pois colonizam trato gastrointestinal e são capazes de sobreviver no ambiente por tempo prolongado sobrevivendo a dessecação e aquecimento. A presença de VRE em hospitais ao redor do mundo é uma realidade e muitas vezes têm sido descrito na forma de epidemias (Neuman *et al.,* 1998).

2.2.1. *Escherichia coli:* Características gerais

A *Escherichia coli* é um BGN, anaeróbio facultativo, não esporulado, com 0,5 µm de diâmetro e 1-3 µm de largura, oxidase negativa. É uma espécie comensal predominante na microbiota anaeróbica, além de ser encontrada no trato gastrointestinal de humanos e animais.

A *Escherichia coli* também pode ser encontrada no solo e na água, como resultado de contaminação fecal. As linhagens patogênicas são divididas entre as causadoras de patologias no trato gastrointestinal e as causadoras de infecções extraintestinais. As infecções extraintestinais podem ocorrer por características invasivas de algumas linhagens, por conta de fatores de virulência. A infecção pode ocorrer pela presença acidental extraintestinal, como em casos de perfuração intestinal, levando a uma peritonite ou em caso de pacientes imunocomprometidos.

A maioria dos isolados é capaz de crescer em um grande intervalo de temperatura (aproximadamente de 15 a 48ºC), mas a sua maior taxa de crescimento se dá entre as temperaturas de 37 e 42ºC. O microrganismo pode crescer em um intervalo de pH que varia entre 5,5 a 8,0 com maior crescimento ocorrendo em pH neutro (Brenner, 1984).

2.2.2. *Klebsiella pneumoniae:* Características gerais

A *Klebsiella pneumoniae* é um BGN, anaeróbio facultativo, não esporulado, imóvel, aeróbio facultativo, de tamanho variando de 0,3 x 1,5 µm a 0,4 x 2,0 µm. Dentre as espécies do gênero *Klebsiella,* a espécie *K. pneumoniae* é a mais importante e frequente. Não produz gás sulfídrico (H2S), nem a enzima citocromo oxidase. Tem a capacidade de utilizar o citrato como única fonte de carbono e possui a enzima lisina descarboxilase. No ágar EMB

(Ágar eosina, azul de metileno), produz colônias róseas elevadas com centro negro, brilhantes, de consistência mucóide devido à produção de cápsula. São ubíquas na natureza, podendo ser encontradas em águas, esgoto, solo e na superfície das plantas. A relação deste gênero com humanos varia desde a colonização a infecções, principalmente em pacientes hospitalizados. Pode colonizar a pele, nasofaringe e o trato gastrointestinal (Brenner, 1984; Koneman *et al.,* 2008).

2.2.3. *Pseudomonas aeruginosa:* Características gerais

A *Pseudomonas aeruginosa* é um BGN-NF (0.5 a 1,0 x 1,5 a 5 µm), ubíqua, com predileção por ambientes úmidos, sendo encontrada no solo, água e plantas. É oxidade positiva, aeróbio, mas pode crescer em condições de anaerobiose utilizando o nitrato ou a arginina como aceptor final de elétrons, é móvel, produz pigmentos hidrossolúveis, tais como a pioverdina (pigmento fluorescente) e a piocianina (pigmento fenazina de cor azul), responsáveis pela cor característica verde brilhante. Algumas linhagens também produzem outros pigmentos hidrossolúveis como piorrubina (avermelhado para o marrom), ou piomelanina (marrom a preto). Conseguem tolerar uma ampla variedade de temperatura (4℃ a 42℃). São capazes de utilizar diversos compostos orgânicos como fonte de carbono e nitrogênio e de crescer em meios de cultura contendo somente acetato como fonte de carbono e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, mostrando sua grande versatilidade nutricional (Pollack, 1995).

O morfotipo mucóide é devido a produção de grandes quantidades de um mucopolissacarídeo denominada alginato que envolve a célula. A sua produção é em última instância responsável pelo mau prognóstico e pelas altas taxas de mortalidade entre os pacientes com fibrose cística (Koneman *et al.,* 2008).

2.2.4. *Acinetobacter baumannii:* Características gerais

O gênero *Acinetobacter* é composto por BGN-NF, geralmente que se apresentam na forma de cocobacilos aos pares, aeróbio, não fermentadores, não fastidiosos, imóveis, catalase positivo e oxidase negativo (Koneman *et al.,* 2008). Possui elevada versatilidade nutricional e metabólica, podendo adaptar-se facilmente a diferentes ambientes. Várias espécies têm sido isoladas do solo, da água, de vegetais, de animais, da pele e do trato gastrointestinal de seres humanos saudáveis. Além disso, no ambiente hospitalar, algumas espécies foram isoladas de objetos inanimados.

2.2.5. *Staphylococcus spp:* Características gerais

Os *Staphylococcus* são bactérias pertencente à família *Staphylococcaceae,* que se apresentam como CGP com 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, isolados ou aos pares, em pequenas

cadeias de três a quatro células ou em cachos, são anaeróbios facultativos imóveis, não formam esporos, produtores da enzima catalase, com raras exceções (*S. saccharolyticus* e da subespécie *S. aureus anaerobius)*, capazes de crescer em meio contendo até 10% de cloreto de sódio e a temperatura ótima de crescimento está entre 30 e 37ºC. Apresentam colônias grandes em meios de cultura (1 a 2 mm de diâmetro), podem ter tonalidade branca, creme, até o amarelo-ouro (Koneman *et al.,* 2008).

O gênero *Staphylococcus* apresenta 49 espécies e 26 subespécies (Euzéby, 2014) e divide-se em dois grandes grupos, de acordo com a produção da enzima coagulase, que é responsável pela conversão do fibrinogênio sanguíneo em fibrina: *Staphylococcus* coagulase positivo, tendo como seu principal representante o *S. aureus* e os *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN) onde podemos destacar o *S. epidermidis* (Koneman *et al.,* 2008).

Os SCN fazem parte da microbiota normal da pele e mucosas. Dentre os SCN podemos destacar o *S. epidermidis.* Portanto, um dos principais desafios do trabalho de diagnóstico diário no laboratório de microbiologia é distinguir SCN clínicamente significativo de linhagens contaminantes. Estão entre as bactérias mais frequentemente isoladas no laboratório de microbiologia clínica e vem se tornando cada vez mais importante, especialmente como causas de infecções hospitalares graves.

2.2.6. *Enterococcus* spp.: Características gerais

Os enterococos são CGP que geralmente se dispõem aos pares e em curtas cadeias. São anaeróbios facultativos, não produzem gases e têm a habilidade de crescer em temperaturas que variam de 10 a 45ºC, apresentando ótimo crescimento a 35ºC com prova da catalase negativa, bile-esculina positivos e crescimento em caldo com 6,5% de NaCl a 45ºC. São naturalmente resistentes a vários ANTs e em diversas situações clínicas os pacientes com infecção necessitam de dois ANTs para o tratamento. Os enterococos são parte da microbiota normal do homem e vertebrados. Podem sobreviver em condições adversas em vários ambientes, tais como solo, água, alimentos e dispositivos médicos (Neuman *et al.,* 1998).

2.3. Linhagens bacterianas frequentemente isoladas em ICS

No estudo multicêntrico MYSTIC (*Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection*), dados coletados de pacientes provenientes de sete CTI em quatro cidades brasileiras, para os BGN, causando IRAS (n=503), *P. aeruginosa* (33%) foi o mais frequentemente isolado, seguido de *A. baumannii* (17.1%), *K. pneumoniae* (12.1%) e *E. coli* (10.5%) (Mendes *et al.,* 2005).

Em relação a resistência, a *P. aeruginosa* e *A. baumannii* apresentavam taxas de resistência a imipenem 36,1% e 10,4%, a meropenem de 33,1% e 10,5%, a piperacillina/tazobactam 30,1% e 46,5%, ciprofloxacina 36,2 e 55,8%, suscessivamente. Todas as linhagens de *K. pneumoniae* e *E. coli* foram sensíveis a carbapenêmicos. A resistência a carbapenêmicos ainda era rara em enterobactéria, taxas elevadas estavam presentes somente em BGN-NF (Mendes *et al.,* 2005).

Porém este quadro mudou entre os BGN, a família *Enterobacteriaceae* são considerados os principais agentes etiológicos e nos últimos anos vêm se destacando pela aquisição de plasmídios de resistência, levando a grande preocupação para os clínicos, devido as poucas opções terapêuticas, gerando aumento nos custos relacionados ao paciente e taxas de mortalidade, tornando um dos maiores desafios de saúde pública.

Um estudo realizado pela Rede Nacional de Monitoramento de Resistência Microbiana em Serviços de Saúde (Rede RM), desenvolvida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), relatou a ocorrência de ICS em pacientes em CTI, envolvendo 75 hospitais brasileiros. Esse estudo mostrou que 47% das linhagens isoladas corresponderam ao gênero *Staphylococcus,* sendo 18% *S. aureus*, seguido por 13% de *K. pneumoniae*, 11% de *P. aeruginosa,* 11% de *Acinetobacter* spp., 6% de *Enterobacter* spp., 5% de *Enterococcus* spp., 4% de *Candida* spp. e 3% de *E. coli.* (ANVISA, 2009). Dados da Rede RM, no ano de 2012, em que foram monitoradas as ICS em pacientes adultos internados em CTI de 908 hospitais no Brasil, mostraram *K. pneumoniae* ocupa o terceiro lugar dos mais isolados (12,4%) e *E. coli* o sétimo lugar (5,9%) (ANVISA, 2014).

Marra e colaboradores relataram em um estudo prospectivo SCOPE *(Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiological Importance)* envolvendo 2.563 pacientes (junho 2007 a março de 2010), em 16 hospitais brasileiros em que aproximadamente 5% das ICS foram polimicrobianas (n=116). Dos 2.447 episódios monomicrobianos, os BGN foram responsáveis por 58,5% (n=1.432) destas ICS, os CGP 35,4% (n=867) e 6,1% os fungos. Os mais frequentes patógenos foram *S. aureus* (14,0%), *Staphylococcus* coagulase negativa (12.6%), *Klebsiella* spp. (12.0%) e *Acinetobacter* spp. (11.4%). A taxa de mortalidade bruta foi de 40% e 49% para os que estavam internados no CTI. O CVC foi o fator agravante para estes pacientes (70,3%). Interesante notar que a resistência a imipenem tinha aumentado muito em relação a anos anteriores: 55,9% em *Acinetobacter* spp. e 36,8% em *P. aeruginosa.* As linhagens de *S. aureus* resistentes a meticilina conhecidas como MRSA (*methicilin resistant Staphylococcus aureus*), foram encontradas em 43,7% dos *S. aureus.* Este estudo revelou um padrão de ICS em hospitais brasileiro consideravelmente diferente da experiência norte-americana. Uma percentagem muito elevadade BGN, altas taxas de resistência aos carbapenêmicos por BGN-NF e taxas de mortalidade mais elevadas (Marra *et al.,* 2011).

Nos Estados Unidos da América (EUA), um levantamento de dados realizado pela Rede Nacional de Segurança de Saúde (NHSN- *National Healthcare Safety Network*), no período de 2009 a 2010, foram analisados 81.139 patógenos de 69.475 IRAS, 90% foram bactérias e 10% fungos. Mostrou uma prevalência de *S. aureus* (16%), seguido por *Enterococcus* spp. (14%), *E. coli* (12%), SCN (11%), *Candida* spp. (9%), *Klebsiella* spp. (8%), *P. aeruginosa* (8%) e *Enterobacter* spp. (5%). As ICS ocorreram em 40% dos casos associado a CVC. A resistência a carbapenêmicos foi similar em infecções urinárias e ICS relacionadas a cateter, para *Klebsiella* spp. (12.5% e 12.8%, respectivamente) e *E. coli* (2.3% e 1.9%, respectivamente) (Sievert *et al.,* 2013).

Outro estudo NHSN, quando comparado os dois períodos estudados, ocorreu uma variação significativa no aumento da resistência a carbapenêmicos para *A. baumannii* (50% no período de 2007-2008 e 62,6% em 2009-2010), o mesmo não observado em *P. aeruginosa,* que apresentou ligeira diminuição (26,8 e 26,1, respectivamente). As linhagens de *A. baumannii* resistentes a carbapenêmicos, também foram MDR, o que não ocorreu em *P. aeruginosa* com 17,7% e 15,4% de MDR, nos períodos estudados (Sievert *et al.,* 2013).

Analisando a presença de infecções causadas por BGN na América Latina, no período de 2008 a 2010, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae e E. coli* foram os mais importantes patógenos isolados. *E. coli* foi o segundo patógeno mais isolado em ICS (19%). A *P. aeruginosa* foi o principal agente causador de pneumonia (31,2%). Algumas linhagens apresentaram resistência reduzida aos carbapenêmicos e a colistina, além de resistência elevada as cefalosporinas de terceira e quarta geração. Também demonstrou alta resistência a todos as classes de ANTs, exceto a colistin em *P. aeruginosa* e *A. baumannii.* O Brasil foi o país com 40.9% BGN MDR, considerado a maior taxa (Gales *et al.,* 2012).

Os microrganismos do gênero *Staphylococcus* corresponderam em média a 47% de todas as notificações de ICS enviadas, sendo os SCN 29% e os *S. aureus* 18% de total. Nas regiões Sul e Centro-Oeste do Brasil, os SCN atingiram a maior proporção entre os isolados de ICS (40% e 44%), enquanto que nas regiões Sudeste, Nordeste e Norte, a proporção de SCN foi de 26%, 25% e 18%, respectivamente (ANVISA, 2009). Estes dados mostram a importância destes patógenos como prováveis agentes de infecções com risco de morte.

Pela Rede RM, foram analizados entre 2006 a 2008, 2.406 microganismos, sendo que, do gênero *Staphylococcus* testados, 80% do SCN foram resistentes a oxacilina (n=1483) e em 61% dos *S. aureus* (n=897). Os maiores níveis de resistência dos *S. aureus* à oxacilina foram observados nas regiões Norte (73%) e Centro-Oeste (72%), sendo semelhantes para as regiões nordeste (61%), sudeste (59%) e sul (58%) (ANVISA, 2009).

Um estudo conduzido ao longo de um período de 7 anos (1999-2005), pelo Departamento de Nefrologia do Hospital Universitário na Grécia foram identificados 148

episódios de ICS em 102 pacientes, com média de idade de 70 anos, maioria do sexo feminino, onde 96 episódios (65%), foram causados por bactérias Gram-Positivas estando 55% dessas infecções relacionadas ao crescimento de *S. aureus,* seguido de *S. epidermidis* (26%) e BGN 23%, tendo a *E. coli* (39%) a mais frequente. ICS polimicrobianas ocorreu em 9.5%, que predispor ao resultado desfavorável. As ICS (84%), foi fortemente associada ao uso de cateter. A mortalidade atribuída a ICS ocorreu em 12% (Fysaraki *et al.,* 2013).

Um estudo recente demonstrou que culturas de sangue de 397 pacientes, em CTI de um hospital de queimados, os microganismos mais frequentes foram: *P. aeruginosa* (169, 30.1%), *A. baumannii* (107, 19.0%) e *S. aureus* (81,14%). Nos BGN, a resistência a carbapenêmicos foi de 95,9% em *P. aeruginosa* e 95,3% de *A.baumannii,* 75.0% de *K. pneumoniae* foram ESBL, 96,3% dos *S.aureus* foram MRSA e 36,2% das espécies de *Enterococcus* foram VRE (Lee *et al.,* 2013b).

2.4. Taxas de mortalidade em infecções de corrente sanguínea

Um estudo de coorte retrospectivo realizado entre julho de 1989 e junho de 2004, para determinar a prevalência e impacto na mortalidade de atrasos no início da terapia antimicrobiana em 14 CTI, no Canadá e nos Estados Unidos, em 2.731 pacientes adultos com choque séptico, concluiram que a dministração do ANT eficaz dentro da primeira hora de hipotensão foi associado como aumento da sobrevida. A cada hora de atraso na administração de ANT adequado, ocorre com uma redução média de sobrevida de 7,6%. (Kumar *et al.,* 2006).

Na Unidade de Tratamento Neonatal (UTIN), ICS continuam também sendo a causa de alta mortalidade, principalmente entre os BGN. Quando a associação entre o microganismo causando a ICS e a mortalidade foi avaliada, os BGN foram isolados em 78,9% e CGP em 15,8% dos óbitos. Os agentes mais comum entre os isolados, em ordem de frequência, foram *Klebsiella* spp.(36,8%), *P. aeruginosa*(18,4%) e *Enterococcus* spp. (7,9%). Os BGN foram isolados a partir de 85,7% dos pacientes que tinham peso de 1500g ou menos e que foram a óbito (Baş *et al.,* 2010).

As ICS causadas por MRSA estão associadas com mortalidade e morbidade significativas, comparada com paciente com a bacteremia em pacientes causada por *S.aureus* sensível a meticilina/oxacilina (MSSA). Os pacientes com bacteremia por MRSA têm uma taxa de mortalidade quase duas vezes maior, hospitalizações significantemente mais longa e mediana de custos hospitalares significantemente mais altos (Cosgrove *et al.,* 2005; Primo *et al.,* 2012).

Em 2011-2012, foi investigado um surto de *P. aeruginosa* extremamente resistente (n=27) na Itália, afetando crianças com doenças onco-hematológicas. A taxa de mortalidade foi de 67% nas 12 crianças com bacteremia, sensíveis apenas uma ou duas classes de

ANTs (apenas colistina em 22 pacientes, colistin e amicacina em 4, ciprofloxacin e colistin em 1) (Ciofi Degli Atti *et al.,* 2014).

5Kumar e colaboradores, durante o período do estudo entre 2010 e 2012, observaram que em recém nascidos as ICS por *A. baumannii* (n=65) a resistência a carbapenêmicos (n=33), aumentaram significantemente as taxas de mortalidade (27,3%), comparadas com as linhagens sensíveis (9,4%) (Kumar *et al.,* 2014). Um estudo retrospectivo realizado em um Hospital Universitário em Londres, houve uma diminuição do isolamento de MRSA e BGN MDR em ICS no CTI e a taxa de mortalidade foi de 32% em 2013 (45% em 2000) (De Santis *et al.,* 2014).

2.4.1. Tratamento empírico

A incidência elevada de infecções devido a BGN MDR é preocupante e os pacientes infectados com estas linhagens podem receber inicialmente uma terapia ineficaz para o tratamento destes microrganismos. Foi realizado um estudo retrospectivo, envolvendo 286 pacientes, para avaliar o efeito da terapia inadequada na sobrevivência destes pacientes com ICS por BGN MDR: *E. coli* (n=61), *K. pneumoniae* (n=65), *P. aeruginosa* (n=74) e *Enterobacter* spp. (n=86). Dos 286 pacientes, 135 (47,2%) receberam terapia antimicrobiana empírica inicial adequada e os restantes 151 (52,8%) pacientes receberam terapia inadequada. O grupo tratado adequadamente apresentou taxa de mortalidade de 27,4%, enquanto que o grupo tratado inadequadamente foi de 38,4% (P =0,049) (Kang *et al.,* 2005).

Em um estudo de revisão de prontuário dos pacientes, a taxa de mortalidade aumenta muito, se não for induzido uma terapia adequada. Quando a terapia antimicrobiana empírica inicial foi apropriada, a taxa de mortalidade foi de 6% e quando foi utilizada inapropriada a taxa foi de 34% ($p<0.001$) (Fysaraki *et al.,* 2013).

Em um outro estudo recente, os investigadores analizando a terapia empírica com vancomicina, devido a alta prevalência de MRSA em bacteremias, observaram que terapia prévia com vancomicina para os MSSA, está associado a 2-3 vezes mais o risco de morbidade e mortalidade em comparação com uma penicilina antiestafilocócica (oxacilina) ou cefalosporina de primeira geração (McConeghy *et al.,* 2013). Isto demonstra a importância da identificação e TSA rápido do microganismo em questão. O tratamento empírico representa mais de 70% dos ANTs usados no CTI. Muitos estudos apontam para a presença de microganismos MDR, como causa e consequência do tratamento empírico inadequado e o atraso na administração de ANTs apropriados. Estas duas situações estão associadas com o aumento da morbidade e mortalidade (Lee *et al*., 2005). Métodos rápidos para detecção da resistência aos ANTs são de extrema necessidade.

2.5. Resistência aos antimicrobianos

A resistência aos ANTs entre os patógenos causadores de infecções é um problema mundial importante, que deve ser tratada de forma contínua. Os programas de vigilância são ferramentas valiosas e podem oferecer informações importantes sobre as tendências de resistência bacteriana, por localização geográfica e por tipo de doença na comunidade e na área hospitalar. Além disso, informações sobre a Concentração Inibitória Mínima (CIM), gerado por esses programas ajudam a direcionar a terapia antimicrobiana antes que os TSA estejam disponíveis, ajudando a evitar o uso excessivo de ANTs. No entanto, os programas de vigilância são limitados em sua capacidade de resolver todos os problemas de resultados clínicos e microbiológicos. Assim, esforços devem ser feitos para entender melhoras tendências de resistência bacteriana, para escolher os regimes antimicrobianos mais apropriados para o tratamento empírico, visto as altas taxas de mortalidade e custos já apresentadas.

2.5.1. Antimicrobianos

Atualmente, a grande maioria dos agentes ANTs utilizados para o tratamento de infecções bacterianas e estão categorizados de acordo com seu principal mecanismo de ação, representados por inibição da síntese proteica, interferência na síntese de ácidos núcleicos, inibição de vias metabólicas, rompimento da membrana celular, interferência na síntese da parede celular (Tenover, 2006).

No presente estudo o mecanismo de ação que interferem na síntese da parede celular e promovem a lise celular, como os glicopeptídeos (vancomicina) e beta-lactâmicos (carbapenêmicos), foram abordados. Os beta-lactâmicos da classe dos carbapenêmicos são os de maior espectro de ação e são resistentes a hidrólise pela maioria das beta-lactamases, como a ESBL (beta-lactamase de espectro estendido) e a AmpC (cefalosporinase cromossômica). São indicados para o tratamento de infecções graves causadas por BGN ESBL positivos e AmpC, CGP e anaeróbios. Não possuem atividade contra *Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus* resistente à meticilina e *Stenotrophomonas maltophilia*. Atualmente, existem três carbapenêmicos liberados para uso no Brasil: imipenem, meropenem e ertapenem. Comparado com imipenem e meropenem, o ertapenem possui menor espectro de atividade, pois não é ativo contra *P. aeruginosa* e *Enterococcus* spp. (Greenwood, 2000; Koneman *et al.,* 2008).

Manchanda e colaboradores propuseram uma classificação do perfil de resistência das cepas de *Acinetobacter* spp. como Multidroga-Resistente (MDR) para os isolados resistentes a pelo menos três classes de antimicrobianos, entre eles, todas as penicilinas e cefalosporinas (incluindo combinações com inibidores), fluoroquilonas e aminoglicosídeos; Extrema-Resistência (XDR) para os isolados resistentes as classes descritas em MDR,

mais a resistência aos cabapenêmicos; e os Pan-Resistentes (PDR), resistentes a todas as penicilinas e cefalosporina (incluindo combinações com inibidores), fluoroquilonas, aminoglicosídeos, cabapenêmicos, polimixinas e tigeciclina (Manchanda *et al.,* 2010). Esta classificação é aceita para as outras linhagens bacterianas.

2.5.2. Importância da resistência bacteriana

Um dos maiores problemas associados com a terapia antimicrobiana é a resistência bacteriana que resulta na falha do tratamento, em infecções graves de mcrorganismos MDR e tem aumentado nos últimos anos e complicando significativamente o tratamento de infecções em pacientes críticos, especialmente os do CTI e imunocomprometidos levando as altas taxas de mortalidade, tornando a maior preocupação para a comunidade científica nos dias atuais (Livermore, 2012; Nordmann *et al.,* 2012).

As bactérias podem apresentar resistência aos ANTs devido a resistência intrínseca a uma ou mais classe de ANTs, onde todas as linhagens da mesma espécie vão apresentar resistência a todos os representantes de uma determinada classe ou pela resistência adquirida, onde linhagens bacterianas inicialmente susceptíveis a ANTs, se tornam resistentes através de mutação e seleção, ou pela aquisição de genes de resistência, podendo se proliferar e se disseminarem sob a pressão seletiva do uso desse ANT (Tenover, 2006).

Os mecanismos que envolvem a resistência bacteriana são vários: a produção de enzimas que inativam as moléculas dos ANTs (por exemplo, enzimas beta-lactamases e enzimas modificadoras de aminoglicosídeos) (Bush *et al.,* 1995; Smith e Baker, 2002), o aumento nos níveis de produção ou hiperexpressão de bombas de efluxo e outras alterações na parede celular (por exemplo, alterações de porinas) (Nikaido, 2003), as mutações em genes alvo (por exemplo, nos genes de proteínas ribossomais ou nos genes que codificam as proteínas de ligação à penicilina denominadas PBP (*penicillin binding protein*), modificações de uma via metabólica (por exemplo, a expressão de PBPs adquiridos com uma baixa afinidade para as moléculas do ANT) (Zapun, 2008) e a produção de proteínas que protegem o sítio alvo (por exemplo, resistência às quinolonas mediada por genes *qnr* ou enzimas modificadoras do sítio alvo) (Strahilevitz *et al.,* 2009).

O uso empírico do ANT para o patógeno resistente tem contribuído e bactérias resistentes a vários ANT vêm sendo encontradas usualmente não só em instituições de saúde, mas também na comunidade (Tenover, 2006). Resistência a todos ANTs também tem sido descrita, tornando a grande preocupação mundial (Tzouvelekis *et al.,* 2012).

A produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) por bactérias da família *Enterobacteriaceae*, tem aumentado tanto no ambiente hospitalar como na comunidade e causam resistência a penicilinas de amplo espectro, cefalosporinas de 3ª e

4ª geração e monobactâmicos (Bush e Fisher, 2011). Devido a este fato, houve um aumento no consumo dos carbapenêmicos para o tratamento das infecções. Devido à pressão seletiva criada pelo seu uso em larga escala, têm sido observados índices crescentes de resistência a estas drogas. Os microrganismos MDR surgem devido a diferentes fatores, sendo que o principal deles está na utilização empírica e inadequada por parte da população e dos hospitais. Até 2009 os ANTs eram vendidos livremente no Brasil, sem a necessidade de receita médica, levando ao problema da automedicação. Porém, o aumento do seu consumo não está relacionado somente ao uso na terapêutica, mas também em outros setores como na agricultura e agropecuária, que emprega ANTs na ração animal. Além do fato de o mundo globalizado, no qual se vive também contribuir diretamente para a disseminação de microrganismos MDR.

A resistência bacteriana tem sido associada ao aumento das taxas de mortalidade em pacientes com ICS causadas pelas linhagens apresentadas neste estudo: *P. aeruginosa, S. aureus, K. pneumoniae, E. coli, Staphylococcus* coagulase-negativo e *Enterococcus* spp. (Tenover, 2006). Em um estudo pesquisando a presença de bactérias resistentes em efluente de esgoto hospitalar no Rio de Janeiro, Brasil, os autores encontraram diferentes espécies produtoras de ESBLs e também a presença de *K. pneumoniae* produtora de KPC (Chagas *et al.,* 2011).

2.5.3. Resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos

Os ANTs beta-lactâmicos são os mais utilizados na rotina terapêutica devido a sua baixa toxicidade, entretanto os patógenos apresentam diversos mecanismos de resistência a esta classe de drogas. Existem quatro principais mecanismos pelos quais as bactérias podem se tornar resistentes aos beta-lactâmicos: mudança no sítio ativo das PBPs; diminuição da expressão de porinas (OMPs); aumento da expressão bombas de efluxo e produção de enzimas beta-lactamases (Tenover *et al.,* 2006). A produção de beta-lactamases é o mais importante mecanismo de resistência aos beta-lactâmicos e por isto, foi pesquisada nas linhagens bacterianas deste estudo.

2.5.3.1. Produção de beta-lactamases

As beta-lactamases estão amplamente distribuídas entre bactérias Gram-Positivas (GP) e Gram-Negativas (GN). Podem ter localização cromossômica ou plasmidial. O mecanismo de ação dessas enzimas é através da hidrólise do anel beta-lactâmico presente no núcleo estrutural das penicilinas, o ácido 6-aminopenicilâmico que provoca a conversão em ácido penicilóico, que é desprovido de atividade antimicrobiana (Ambler, 1980).

A classificação beta-lactamases proposta inicialmente por Ambler em 1980, baseada na sequência dos aminoácidos (estrutura molecular), se mostrou estável, refletindo as

relações fundamentais entre as moléculas, que não podem ser modificadas por mutações (Ambler, 1980; Bush e Fisher, 2011). Porém no trabalho de rotina de um laboratório de microbiologia clínica, tal abordagem não é útil do ponto de vista clínico, porque não é possível predizer a função enzimática e perfil de susceptibilidade do microrganismo em questão. Para os clínicos é mais importante saber a susceptibilidade do microrganismo do que a sequência de aminoácidos da beta-lactamase. Portanto, a classificação dos pesquisadores Bush, Jacob e Medeiros, proposta em 1995 é a classificação mais aceita, combinando as características funcionais tendo por base as propriedades bioquímicas, estrutura molecular e sequências nucleotídicas, separando as enzimas em quatro grupos funcionais (A, B, C e D) e subgrupos (Bush *et al.,* 1995; Bush e Fisher, 2011).

De acordo com o sítio de ação, as enzimas beta-lactamases são divididas em dois grupos: as enzimas serina (classes molecular A, C e D) e metaloenzimas (classe B) (Bush *et al,* 1995). Durante muito tempo, de classe A beta-lactamases onde estão incluídas as ESBL, foram o grupo mais importante (por exemplo, TEM, SHV, e CTX-M). Depois a classe B metalo-beta-lactamase (MBL), tornaram-se importante devido à sua capacidade de hidrolisar carbapenêmicos.

Os genes que codificam as MBL foram espalhados inicialmente entre *Pseudomonas* spp. e recentemente, estas enzimas se espalharam entre os membros da família *Enterobacteriaceae* em todo o mundo, além de outras carbapenemases como classe A (por exemplo, KPC e GES). Do ponto de vista epidemiológico, a carbapenemase KPC é uma das mais importantes, pois apresentou rápida disseminação mundial após sua descrição inicial (Bush, 2010; Nordmann *et al.,* 2012).

Atualmente, mais de 150 enzimas são classificadas como mediadas por plasmídios. A enzima SHV-1 é cromossomal em amostras de *K. pneumoniae,* porém é tipicamente uma enzima plasmídica. Outras enzimas cromossomais de enterobactérias como a BIL-1, CMY-1, CMY-2, CMY-3, FOX-1 em *Enterobacter* spp. e *Citrobacter* spp., são consideradas enzimas plasmidiais em outros microrganismos. Várias dessas enzimas estão associadas à transposons, que facilitam a disseminação entre diferentes plasmídios e microrganismos (Bush e Fisher, 2011).

2.5.3.1.1. Beta-Lactamases de Espectro Estendido

As ESBLs, são definidas como enzimas das classes A ou D na classificação de Ambler, ou das classes 2be ou 2d classificação de Bush, Jacoby e Medeiros. São capazes de hidrolisar penicilinas de amplo espectro, cefalosporinas de terceira geração e monobactâmicos. Atualmente, existem mais de 500 diferentes ESBLs descritas, sendo a maioria derivada das enzimas TEM ou SHV. As ESBLs mais frequentemente encontradas são do tipo TEM, SHV e CTX-M, entretanto as do tipo OXA, PER, VEB, BES, CMY e GES

também tem sido bastante reportadas (Paterson e Bonomo, 2005; Bush e Fisher, 2011). A primeira beta-lactamase plasmidial foi identificada em 1963 na Grécia, em *E. coli* recuperada de ICS, em uma paciente chamada Temoniera. Daí sua denominação de TEM. A TEM-1 é capaz de hidrolisar penicilinas e cefalosporinas de primeira geração e é inibida por ácido clavulânico. Desde a primeira descrição desta enzima, mais de 200 tipos de TEM já foram identificados (Jacob e Bush, 2014).

As ESBLs do tipo TEM são derivadas de TEM-1 e TEM-2 que não são ESBL. A TEM-2 tem o mesmo perfil hidrolítico da TEM-1, porém tem um promotor mais ativo e difere no ponto isoelétrico. A TEM-13 também é similar a TEM-1 e TEM-2 e também não é uma ESBL. A maioria das ESBLs derivadas de TEM-1, TEM-2 ou SHV-1 diferem por apenas um aminoácido, resultando em uma mudança na atividade enzimática, permitindo que elas sejam capazes de hidrolisar outros fármacos (Paterson e Bonomo, 2005).

A primeira descrição de ESBL do tipo TEM, foi em 1982 na Inglaterra (Liverpool) em *Klebsiella oxytoca,* de uma unidade neonatal onde já havia ocorrido um surto com esta mesma bactéria produtora de TEM-1, onde o tratamento usado para os pacientes foi o ANT ceftazidima. O que se conclui que a pressão seletiva induzida por este fármaco pode ter levado a indução da produção de uma ESBL (Paterson e Bonomo, 2005).

A SHV é outra beta-lactamase muito comum e foi nomeada a partir do termo *"sulfhydril reagent variable".* Ela é mais comumente encontrada em *K. pneumoniae* e em várias linhagens o gene bla_{SHV-1} está integrado no cromossomo. Mutações nestas enzimas deram origem as chamadas ESBLs com espectro de ação amplo hidrolisando várias classes de ANTs (Paterson e Bonomo, 2005). A primeira ESBL descrita foi a SHV-2, na Alemanha em 1983, encontrada em *Klebsiella ozaenae* com capacidade de hidrolisar cefotaxima e em menor grau ceftazidima. Após o sequenciamento desse gene, observou que a SHV-2 era diferente da SHV-1 através da modificação de uma glicina por uma serina na posição 238. Essa mutação sozinha aumentou o espectro de hidrólise dessa enzima (Paterson e Bonomo, 2005).

As ESBLs do tipo CTX-M hidrolisam preferencialmente a cefotaxima e por isto são desginadas de cefotaximases. Estas enzimas são as mais difundidas no mundo, principalmente entre amostras de enterobactérias e foram descritas até o momento, 158 variantes alélicas de CTX-M sendo a CTX-M-15 o subtipo mais encontrado. As CTX-M encontradas são muito semelhantes a ESBL cromossomal presente no gênero *Kluyvera* (Anastay *et al.*, 2013; Jacob e Bush, 2014). A primeira amostra clínica produtora de CTX-M foi isolada na Alemanha, em 1989 em uma amostra de *E. coli* e foi designada CTX-M-1 por conta da sua atividade hidrolítica contra a cefotaxima. No mesmo período em que foi descrita a CTX-M-1, houve uma disseminação muito grande de amostras de *Salmonella* resistentes à cefotaxima na América do Sul (Bonnet**,** 2004).

Em 2008, linhagens de *E. coli* pertencentes ao clone ST131, determinado pela técnica de MLST (*Multilocus sequence typing*), produtoras de CTX-M-15 foram identificadas simultaneamente em nove países diferentes, englobando três continentes (Peirano *et al.,* 2014).

2.5.3.1.2. Carbapenemases

Os mecanismos de resistência a carbapenêmicos*,* não consistem só na produção de enzimas beta-lactamases que degradam e inativam os carbapenêmicos chamadas de carbapenemases, mas também a perda de porinas específicas, hiperexpressão de bombas de efluxo e mutações no sítio de ação dos carbapenêmicos (alteração da proteina-alvo ao qual o ANT se liga) (Peleg *et al.,* 2008).

Entretanto, atualmente pesquisadores de várias partes do mundo tem voltado sua atenção para as enzimas carbapenemases, que são consideradas o mecanismo de resistência mais importante, que apresentam capacidades hidrolíticas versáteis tendo a capacidade de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas, monobactans e carbapenêmicos. Portanto, podem provocar infecções graves, com pouquíssimas opções de tratamento (Queenan e Bush, 2007). São consideradas um problema mundial que ameaça as instituições de saúde, colocando em risco a vida de pacientes.

Os genes que codificam estas enzimas não só foram associados a amostras clínicas, mas também a amostras ambientais. Apesar de serem chamadas de carbapenemases, elas são capazes de hidrolisar totalmente ou parcialmente a maioria dos beta-lactâmicos e não são inibidas pela maioria dos inibidores de beta-lactamases (Ambler, 1980; Queenan e Bush, 2007; Nordmann *et al.,* 2011; Nordmann *et al.,*2012).

As carbapenemases são membros da classe molecular A, B e D de Ambler. A classe A e D têm enzimas hidrolíticas um mecanismo à base deserina, enquanto as enzimas da classe B são metalo-beta-lactamase que contêm zinco no sítio ativo (Nordmann *et al.,*2012). As carbapenemases da classe A de Ambler e 2f de Bush-Jacoby-Medeiros incluem as serino-carbapenemases, inclui membros das famílias SME/IMI, NMC, GES e KPC. Destes, as carbapenemases KPC são as mais prevalentes, sendo endêmicas nos EUA e na Grécia, encontrados principalmente em plasmídeos em *K. pneumoniae.* A enzima deste grupo GES, foi originalmente identificada como da família das ESBLs, mas ao longo do tempo, algumas variantes com certo nível de hidrólise do imipenem foram identificadas (Queenan e Bush, 2007).

As carbapenemases da classe B ou metalo-beta-lactamase (MBLs) pertencem a diferentes famílias (IMP, VIM, SPM, GIM, SIM, entre outras), as mais encontradas são a IMP e VIM, com maior prevalência no sul da Europa, EUA e Ásia e foram detectados principalmente em *P. aeruginosa*; no entanto, há um número crescente de relatos em todo o

mundo de MBL presentes na família *Enterobacteriaceae.* Recentemente, a enzima NDM, uma nova MBL, descrita em 2008 tem se tornado preocupação no mundo todo (Nordmann *et al.,* 2012).

As carbapenemases classe D consistem de betalactamase do tipo OXA e são frequentemente detectadas em *A. baumannii* e foram identificadas principalmente nos países do Mediterrâneo, da Europa e na Índia (Poirel *et al*., 2010). Os genes correspondentes as carbapenemases, são principalmente localizado em plasmídeo e associado a várias estruturas genéticas (sequências de inserção, integrons, transposons), aumentando ainda mais a sua propagação (Peleg *et al.,* 2008; Poirel *et al*., 2010).

Nos últimos 10 anos carbapenemases têm sido relatados cada vez frequentes na família *Enterobacteriaceae*. Surtos esporádicos ou situações endêmicas com BGN não suscetíveis a os carbapenêmicos agora são relatados não apenas em ambientes hospitalares, mas também na comunidade (Nordmann *et al.,* 2012).

2.5.3.1.2.1. Carbapenemases Classe A- KPC

As carbapenemases da classe A podem ser cromossômica e outras plasmidiais como a *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemases (KPC), mas todas hidrolisam os carbapenêmicos. As KPC são as enzimas clinicamente mais comuns neste grupo e a mais prevalente no mundo e por isso, será discutida um pouco mais abrangente. As bactérias produtoras de KPC estão predominantemente envolvidas em IRAS e ICS. A primeira *K.pneumoniae* produtora de KPC (KPC-2) foi descoberta através de um projeto de vigilância ICARE (*Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology*), em 1996, Carolina do Norte nos EUA (Yigit *et al.,* 2001).

Em poucos anos o gene bla_{KPC} se espalhou globalmente e foram descritos casos em todo o EUA, Porto Rico, Colômbia, Grécia, Israel e China (Nordmann *et al.,*2009). Surtos de produtores de KPC também têm sido relatados em muitos países europeus e na América do Sul. O gene bla_{KPC} é encontrado principalmente em linhagens nosocomiais de *K.pneumoniae e* em menor proporção em *E.coli,* principalmente em Israel. Também pode ser encontrada em outras espécies de enterobactérias. Também podem ser encontradas (ainda raro) em *P. aeruginosa* (Nordmann *et al.,* 2011).

Em 2010, pesquisadores na França, estudaram a diversidade de 16 cepas de *K. pneumoniae* isoladas em seis diferentes países, EUA, Grécia, Suécia, Colômbia, Israel e Brasil, mostrou que vários clones de KPC estão disseminando diferindo por tipo de sequência; conteúdo de beta-lactamases adicionais; pelo tamanho, número e estrutura de plasmídeos (ST258, ST337, ST338, ST14, ST 339, ST11, ST277, ST340), mas os genes bla_{KPC} estão associadas a um único elemento genético e é carreado pelo transposon Tn4401 (Cuzon *et al.,* 2010). Embora casos de bactéria podutorade KPC tenham sido

relatados na comunidade, eles ainda são raros, com exceção em Israel (Nordmann *et al.,* 2009), a resistência a carbapenêmicos nestas linhagens, pode variar acentuadamente. O ertapenem é o carbapenem que tem a menor atividade (Yigit *et al.,* 2001). Estas linhagens geralmente são MDR, deixando poucas opções terapêuticas (Nordmann *et al.,* 2009). As taxas de mortalidade atribuídas a infecções com os produtores de KPC são alta (> 50%) (Schwaber *et al.,* 2008).

No Brasil, a KPC foi descrita primeiramente em 2009 em 4 linhagens de *K. pneumoniae* isoladas num hospital do Recife, em 2006. Todas as cepas carreavam a variante alélica KPC-2 e também CTX-M-2. Desde então, uma grande dispersão dessas carbapenemase ocorreu em nosso país (Monteiro *et al.,* 2009). Em 2010, houve uma intensa disseminação desse mecanismo de resistência e foram descritos surtos em diferentes unidades hospitalares em estados brasileiros. Nele, encontra-se o clone epidêmico mundial, ST258, que já foi responsável por surtos nas Américas, na Europa e na Ásia. Hoje, essa carbapenemase já foi encontrada em praticamente todos os estados que compõe a nossa nação. Detecção de bactérias produtoras de KPC pode ser difícil baseado em TSA realizados na rotina. Assim, é fundamental a implementação de medidas de controle de infecção eficientes para limitar a disseminação desses patógenos e testes rápidos para detecção.

2.5.3.1.2.2. Carbapenemases da classe B- Metalo-beta-lactamases

Metalo-beta-lactamases são determinantes de resistência decrescente relevância clínica em BGN. Desde os anos 1990, várias MBLs surgiram em patógenos de BGN importantes: família de *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* e *A. baumannii.* Estas enzimas são encontradas principalmente em países europeus e nos EUA. A mais recente MBL foi descrita inicialmente em 2008 na Suécia, recuperada de um paciente que foi submetido a um procedimento cirúrgico em Nova Deli, na Índia e assim, portanto designada NDM (*New Delhi metalo-beta-lactamase).* Essa enzima NDM, tem sido relatada mundialmente, principalmente em *Enterobacteriaceae,* como *Klebsiella spp.* e *E. coli* (Pittalis *et al.,* 2011), mas também tem sido relatado em muitos outros BGN (Nordmann *et al.,* 2011; Bushnell *et al.,* 2013; Zhou *et al.,* 2014b) e se tornaram a mais recente crise mundial na saúde (Cornaglia *et al.,* 2011).

Em *A. baumannii,* MBLs foram identificadas em diferentes partes do mundo (IMP-like, VIM-like, SIM-1, SPM-1, GIM-1) (Cornaglia *et al.,* 2011) e NDM-1 e NDM-2, (Bushnell *et al.,* 2013). A maioria dos relatos de casos de linhagens produzindo enzimas tipo NDM (a *K. pneumoniae* e *E. coli* foram as bactérias mais frequentes), são de colonização e sem evidência de infecção. Os relatos de casos já publicados, sugerem uma distribuição global de NDM em BGN-F e BGN-NF (Bushnell *et al.,* 2013).

A NDM-1 foi descrita pela primeira vez no Brasil em 2013 em uma amostra de *P. rettgeri* isolada de um paciente no Rio Grande do Sul (Carvalho-Assef *et al.,* 2013). Posteriormente, neste mesmo hospital foi detectada em amostras de *Enterobacter hormaechei* (Carvalho-Assef *et al.,* 2014), sendo portanto possível e previsto a possibilidade da disseminação deste gene para *Acinetobacter* spp. (Carvalho-Assef *et al.,* 2013). Recentemente foi descrito o primeiro caso de NDM-1 em *A.baumanni* (Pillonetto *et al.,* 2014).

Autores mostram preocupações com o grande desafio tanto para o tratamento de pacientes e as políticas de controle de infecção por falta de estrutura na saúde pública no enfrentamento a essa emergência (Cornaglia *et al.,* 2011). Condições de trabalho adequadas, com tecnologias confiáveis, recursos humanos capacitados e qualificados para a identificação acurada do patógeno e política de gerenciamento do uso de ANTs são essenciais para que medidas efetivas de controle de infecção possam ser implantadas com sucesso.

2.5.3.1.2.3. Carbapenemases de classe D- Oxacilinases

Também conhecidas como oxacilinases (OXA) são classificadas dentro do grupo 2 de Bush e na classe D de Ambler, pois possuem serina no seu sítio ativo. São assim designadas por possuírem a oxacilina como substrato preferencial e em geral, são fracamente inibidas pelo ácido clavulânico, EDTA, tazobactam e sulbactam, mas sua atividade pode ser inibida *in vitro* por cloreto de sódio (Ambler, 1980). As oxacilinases são caracterizadas por apresentarem uma importante diversidade genética e uma grande heterogeneidade em termos de hidrólise dos beta-lactâmicos. Nem todas as enzimas possuem capacidade de hidrolisar os carbapenêmicos. As oxacilinases adquiridas podem ter tanto um espectro estreito ou ampliado de hidrólise aos carbapenêmicos. Podem ser encontrados no cromossomo ou em plasmídeos, associados a integrons, sequências de inserção e/ou transposons tanto em amostras clínicas e ambientais (Peleg *et al.,* 2008; Poirel *et al*., 2010).

Segundo Jacob e Bush, atualmente, são reconhecidas mais de 363 enzimas oxacilinases, divididas em 11 grupos, destas pelo menos 65 apresentam atividade contra os carbapenemas (tipo OXA beta-lactamases) (Jacob e Bush, 2014). Dos 11 grupos, atualmente, existem seis subgrupos de oxacilinases com atividade sobre os carbapenemas em *Acinetobacte*r spp: a OXA-51, que constitui um subgrupo de enzima cromossômica que é intrínseca a espécie *A. baumannii*, dos quais existem mais de 70 variantes e as enzimas adquiridas: OXA-23-like, OXA-24-like, OXA-58-like e OXA-143-like, que já foram relatados em *A. baumannii* no Brasil e a recentemente a OXA-243, detectada nos EUA e México.

As enzimas adquiridas são encontradas tanto no cromossoma ou em plasmídeos podendo ser detectadas por PCR multiplex (Poirel *et al.,* 2011). A presença destas enzimas confere diferentes níveis de resistência e a coexistência com uma outra oxacilinase é comum (Peleg *et al.,* 2008;Opazo *et al.,* 2012).

2.5.3.2. Considerações finais da resistência por beta-lactamases

A resistência a beta-lactâmicos e outros ANTs em *Enterobacteriaceae* é frequentemente associada a plasmídios que são facilmente transferidos entre as espécies. Esta resistência está cada vez mais associada a ESBL e carbapenemases, especificamente a família CTX-M de ESBLs, a família decarbapenemases do grupo serina como KPC, as metalo-beta-lactamase VIM, IMP, e NDM, e as oxacilinases. Estas enzimas estão aparecendo agora em múltiplas combinações de ESBL e carbapenemases, conferindo assim a resistência a praticamente todos os ANTs beta-lactâmicos (Bush, 2010).

As infecções causadas por essas bactérias estão associadas a altas taxas de morbidade e mortalidade. As duas classes de ANTs disponíveis para o tratamento em linhagens que se mostram sensíveis, como as polimixinas (colistina e polimixina B) e glicilciclinas (tigeciclina), têm demonstrado atividade *in vitro* porém o perfil de segurança de ambos é questionável (Monteiro *et al.,* 2009).

A detecção de pacientes infectados e colonizadores são necessário para a prevenção da propagação das beta-lactamases. A identificação dos genes que codificam as carbapenemases é realizada por técnicas moleculares (PCR), a utilização de meios de cultura seletivos para a triagem ativa, pode ser útil no laboratório de rotina para estudo dos portadores. Esta estratégia pode ajudar a prevenir o desenvolvimento de surtos hospitalares (Nordmann *et al.,* 2012). Novas pesquisas devem ser direcionadas para o desenvolvimento de ANTs seguros para o tratamento desses tipos de infecções.

2.6. Importância clínica e epidemiologia das linhagens bacterianas deste estudo

2.6.1. Enterobactérias: *E.coli* e *K. pneumoniae*

Em um estudo associado ao sistema de vigilância SENTRY (SENTRY antimicrobial Surveillance Program) avaliaram a prevalência de bactérias causadoras de infecções em hospitais de países da América Latina. Em ICS a *E. coli* foi o segundo microrganismo mais isolado (19%), seguido de *K. pneumoniae* (12,3%) (Gales *et al.,* 2012). A análise molecular de 94 linhagens ESBL positivas revelou a presença de genes $bla_{TEM,}$ bla_{CTX-M} e bla_{SHV} em 84 (89,3%), 86 (91,4%), e 68 (72,3%), respectivamente. Este fato representa a comum associação de genes de resistência. A resistência à imipenem e meropenem foi visto em 0,3% e 1,3% dos isolados. Entre os isolados resistentes aos carbapenem, foi detectado o gene bla_{KPC} em 3 isolados (Marra *et al.,* 2011).

Na França, um estudo com 62 linhagens produtoras de ESBL, confirma uma grande mudança na epidemiologia ESBL, com o surgimento de ESBL do tipo CTX-M (88%), principalmente a variante CTX-M-15 e um aumento da prevalência de ESBL em *E.coli* . Em 1999, *Enterobacter aerogenes* foi predominante (48,7%) e diminuiu para 18,8% em 2007. O inverso ocorreu com *E.coli* (10,5% de ESBL em 1999, cresceu para 37,5% em 2007) (Anastay *et al.,* 2013). De acordo com o relatório da Organização Mundial da Saúde (OMS) publicado em 2014, linhagens de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenêmicos varia de 0 a 4% no continente Africano, de 0 a 11% nas Américas e de 0 a 8% no Sudeste Asiático e na região do Oeste do Pacífico. Em países europeus e no leste do mediterrâneo, o percentual é muito mais elevado, variando de 0 a 68% e 0 a 54%, respectivamente (OMS, 2014).

2.6.2. *Acinetobacter baumannii*

A identificação fenotípica não é capaz de distinguir todas as espécies, mesmo utilizando diversos testes bioquímicos convencionais. Os sistemas modernos automatizados apresentam dificuldades em alguns casos. Das espécies que compõem o gênero, quatro delas são estritamente relacionadas: *A. calcoaceticus, A. baumannii,* A. genoespécie 3 e genoespécie 13 TU. Então foi proposto o complexo *A. calcoaceticus-baumannii*. Atualmente as genoespécies 3 e 13 TU receberam nova nomenclatura passando a ser designadas por *A. pittii e A. nosocomialis,* respectivamente e estão cada vez mais sendo reconhecidas como clínicamente importantes. Somente após o surgimento da biologia molecular, com as técnicas de hibridização DNA-DNA novas espécies foram descobertas e reclassificadas (Nemec *et al.,* 2011). Existe discordância entre os autores quanto ao número de espécies descritas. No banco de dados *"List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature"* (LPSN), atualmente o gênero *Acinetobacter* possui 34 espécies (LPSN, 2014).

O complexo *A. baumannii-calcoaceticus* é principal causa de infecção nosocomial em todo o mundo e a maioria das infecções são graves com risco de morte, como ICS e pneumonia associada a ventilação mecânica, principalmente em pacientes imunocomprometidos no ambiente hospitalar tornando-se uma preocupação global porque *A. baumannii* é frequentemente resistente a múltiplos ANTs. Na década passada, o *A baumannii* era considerado um patógeno de baixa virulência, porém a análise do genoma mostra sua evolução, com capacidade de aquisição de determinantes de resistência aos ANT e a agentes desinfectantes, o que dificulta sua erradicação e explica o fato da colonização ser maior que infecção. Este também é um desafio para os clínicos e o laboratório de microbiologia clínica, porque novos genes de virulência podem ser adquiridos. Dentre as espécies do complexo, o *A. baumannii* é o mais isolada no ambiente hospitalar e é endêmico em muitos países, causando surtos (Nordmann *et al.,* 2011). Sua

prevalência é superior a 10% dos isolados BGN e entre os BGN-NF é a mais isolada (Gales *et al*., 2012).

2.6.2.1. Resistência a carbapênemicos em *A. baumannii*

O aumento da incidência de resistência a carbapenêmicos em *A.baumannii* em todo o mundo é uma preocupação, uma vez que limita drásticamente as alternativas terapêuticas, ficando reduzido o tratamento ao uso de polimixinas e tigeciclina. Entretanto a resistência a estes ANTs já foi relatado (Gan et *al*., 2012). O mecanismo mais importante e comum de resistência a carbapenêmicos em todo o mundo é a hidrólise enzimática mediada por carbapenemases. Em *A. baumannii* estas enzimas são geralmente do tipo OXA-carbapenemases (oxacilinases) e pertencem a classe D, de acordo com a classificação de Ambler. A primeira enzima identificada do tipo OXA, com atividade sobre os carbapenemas, foi descrita em *A. baumannii* na Escócia em 1985. Inicialmente chamada de ARI-1, estava localizada em um plasmídeo de fácil transferência, após seu sequenciamento, ARI-1 passou a ser chamada de OXA-23 (Opazo *et al.,* 2012).

Verifica-se que os altos níveis de resistência a carbapenêmicos devido a expressão de genes codificadores de oxacilinases, ocorre pela presença de um forte promotor, como a sequência de inserção ISAba1, que é comumente encontrada em *A. baumannii* (Carvalho *et al.,* 2009). Uma pesquisa feita com objetivo de estudar a relação clonal de enzimas NDM-1 encontradas em *A.baumannii,* através da análise de uma coleção de *A. baumannii* com o gene $bla_{\text{NDM-1}}$, recuperados de diferentes países europeus, revelou que ocorreu a disseminação de NDM-1 em *A.baumannii* na Europa do oeste para o leste, porém não foi devido a um único clone, nem por plasmídeo, mas sim por diferentes clones (Bonnin *et al.,* 2012).

Em um estudo realizado em hospitais brasileiros, as cefalosporinas, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e carbapenêmicos não foram ativos contra 50% das linhagens testadas de *Acinetobacterspp.* recuperadas de ICS. Foi realizada análise molecular em 112 isolados resistentes a carbapenêmicose foi detectado o gene $bla_{\text{OXA-23}}$ em 75,9% (n=85) (Marra *et al.,* 2011). Outro estudo recente na Índia, para determinar os mecanismos de resistência mediados por plasmídeo, foi observado a ocorrência de diferentes genes de resistência em vários plasmídeos nas 55 linhagens de *A. baumannii* MDR. O percentual do gene $bla_{\text{OXA-51,}}$ $bla_{\text{OXA-23}}$ e $bla_{\text{IMP-1}}$ em plasmídeos encontrados foram de 78%, 42% e 36%, respectivamente. Isso indica a necessidade urgente de medidas preventivas para evitar a disseminação de determinantes de resistência através de plasmídeos em ambientes clínicos (Saranathan *et al.,* 2014).

2.6.3. *Pseudomonas aeruginosa*

As infecções por *P. aeruginosa* são de difícil tratamento devido à existência de limitadas escolhas de agentes ANTs. É uma dasprincipais causas de ICS e pneumonia (Yang*et al.,* 2011). O trato gastrointestinal é oprincipal local decolonização e a fonte mais frequente de infecção, onde até 50% dos pacientes críticos se tornam colonizados dentro de 3 dias de internação, com até 30% das linhagens exibindo resistência a ANTs (Bertrand *et al.,* 2001). Vários surtos podem ocorrer provocados por transmissão de paciente para paciente, fontes ambientais ou dispositivos médicos contaminados. É um patógeno oportunista e uma importante causa de infecções associadas a IRAS, não somente em adultos mas principalmente em crianças. Já foram relatados vários surtos e ICS (Ciofi Degli Atti *et al.,* 2014).

Quinze estudos que descrevem um total de 414 crianças colonizadas ou infectadas por *P. aeruginosa* foram revisados e 22% dos pacientes previamente colonizados adquiriram infecções. O uso de cateter venoso umbilical foi associado com ICS. O baixo peso dos bebês prematuros foi o maior risco de mortalidade. Em 14 estudos de amostras ambientais, 9 foi detectado a presença de *P. aeruginosa.* O aumento da idade e uso de unhas artificiais foram fatores de risco para a colonização das mãos dos profissionais de saúde (Jefferies *et al.,* 2012). As IRAS causadas por *P.aeruginosa* resitentes aos ANTs beta-lactâmicos são um dos alvos mais difíceis para a terapia, levando a aumento substancial nas taxas de mortalidade nos hospitais em todo o mundo. A *P. aeruginosa* abrigando mecanismos de resistência adquirida, como a produção de metalo-beta-lactamase (MBL) e de ESBL têm o maior impacto clínico.

2.6.3.1. Resistência a carbapnêmicos em *Pseudomonas aeruginosa*

Nos últimos anos os ANTs mais utilizados para o tratamento das infecções por *P. aeruginosa* são os carbapenêmicos, principalmente em ICS. Entretanto, devido ao largo emprego, têm sido observados índices crescentes de resistência a essa classe de ANTs, principalmente em CTI e tem-se observado, mundialmente, o aparecimento de *P. aeruginosa* MDR apresentando este mecanismo de resistência adquirida. As principais carbapenemases encontradas em *P. aeruginosa* são do tipo MBL. Atualmente, já estão descritas centenas de MBLs sendo, IMP e VIM, as mais prevalentes no mundo *(*Witney *et al.,* 2014). No Brasil em 2006, observou-se a presença de SPM-1 em 20% de linhagens de *P.aeruginosa* resistentes a imipenem isolados em um hospital no Rio de Janeiro, Brasil. Já em 2009, encontrou-se 62,8% em um hospital de São Paulo, Brasil, produtores de MBL tipo SPM e 2,3% MBL do tipo IMP-1 (Carvalho *et al.,* 2006; Picão *et al*., 2009).

Em 2.563 ICS analizadas, em 212 linhagens de *P. aeruginosa*, 36,8% foram resistentes a imipenem e 35,8% (n=201) a meropenem, seguido de 33,9% (n=174),

36,6%(n=205) e 42,9%(n=205), resistentes a piperacilina-tazobactam, ceftazidima, cefepime, respectivamente. O gene *bla*$_{IPM}$ esteve presente em em 6 (10%) e o gene *bla*$_{SPM}$, em 24 (41%) em *P. aeruginosa* com resistência a carbapêmicos (n=59) (Marra *et al.,* 2011).

Até o momento, a resistência a carbapenêmicos por carbapenemase, parece que a enzima SPM está restrita ao Brasil. Após a primeira descrição do gene *bla*$_{SPM-1,}$ esta enzima tem sido associada a um único clone epidêmico MDR em diferentes cidades brasileiras: São Paulo, Salvador, Londrina, Curitiba, Brasília, Santo André, Recife e Rio de Janeiro. Existe apenas um relato de uma linhagem de *P. aeruginosa* produtora de SPM-1 isolada na Suíça. Contudo, o paciente infectado havia sido transferido do Brasil para a Suíça (Poirel *et al.,* 2004; Carvalho et al., 2006; Gales *et al.,* 2003; Witney *et al.,* 2014).

Nos anos de 2011 e 2012, na Itália, foi investigado um surto de *P.aeruginosa* XDR, afetando 27 crianças com doenças onco-hematológicas. Doze tiveram bacteremia com alta taxa de mortalidade (67%), 6 crianças tiveram outros tipos de infecções e 9 estavam colonizados. As linhagens foram susceptíveis aapenas uma ou duas classes de ANTs. A colistina foi sensível em 22 linhagens. (Ciofi Degli Atti *et al.,* 2014).

Um estudo desenvolvido em um hospital brasileiro com 720 leitos, mostrou que das 56 linhagens de *P.aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos que foram avaliadas quanto apresença degenesde MBL e ESBL, os genes para a MBL como o *bla*$_{SPM-1}$ ou *gene bla*$_{IMP-1}$foram detectadas em apenas 26,7% das linhagens, não sendo portanto o principal mecanismo de resistência para os carbapênemicos, sugerindo outros mecanismos como a ocorrência de bombas de efluxo, a redução nos canais de porina e produção de outras enzimas beta-lactamases. Entretanto, os genes que codificam as ESBL foram detectados em 23,2%, sendo o gene *bla*$_{CTX-M-2}$ (19,6%) o mais frequente, seguido pelos *genes bla*$_{GES-1}$ *e bla*$_{GES-2}$ em duas linhagens. Isto mostra a presença de ESBL devido a grande capacidade apresentada por este patógeno para adquirir múltiplos mecanismos de resistência. Em todos os isolados apresentando fenótipo MBL pelo teste fenotípico de sinergia de duplo disco, foram detectados os genes *bla*$_{SPM-1}$ ou *gene bla*$_{IMP-1}$. Interessante ressaltar que o gene *bla*$_{IMP-1}$ também foi detectado emtrês isolados que não apresentavam qualquer fenótipo MBL, mas também apresentaram o gene *bla*$_{CTX-M-2}$ (Polotto *et al.,* 2012).

Estes resultados levantam a preocupação com o futuro da terapia antimicrobiana e a capacidade dos laboratórios clínicos para detectar cepas resistentes, já que a produção simultânea de MBLs e ESBLs é conhecida por promover ainda mais a complexidade na detecção fenotípica. Apesar de ainda não vem sendo descrito com frequência a presença de carbapenemase pertencentes ao grupo das oxacilinases (grupo D) em *P. aeruginosa*, este é mecanismo de resistência provável no futuro.

2.6.4. *Staphylococcus* spp.

Até a década de 80, o isolamento de um SCN a partir de espécimes clínicos, principalmente sangue, era considerado contaminação de coleta. Entretanto, atualmente são reconhecidos como importantes patógenos oportunistas humanos, sendo responsáveis por 30 a 40% das infecções de corrente sanguínea (Casey *et al.,* 2007). Atualmente, os SCN são as linhagens mais frequentemente detectados em culturas de sangue positivas e não existe um padrão ouro para determinar se é patogénico ou contaminante. O Centro de *Controle* e Prevenção de *Doenças CDC* (Centers for Disease *Control* and Prevention), considera que se mesmas linhagens de SCN foram isoladas de mais de um frasco de hemocultura, coletadas em sítios anatômicos distintos, este SCN pode representar infecção do sangue. Assim, os métodos rápidos e precisos, capazes de identificar as espécies do SCN, pode minimizar regime do ANT desnecessário reduzindo os custos.

A partir da década de 70, o uso aumentado de ANTs beta-lactâmicos levou ao surgimento de MRSA em diversas partes do mundo. O surgimento da resistência a oxacilina em *S. aureus* está relacionada à aquisição do gene *mecA*, que é responsável pela produção de PBP alterada, de 78 kDa, chamada PBP 2a (Ito *et al*., 2003).

2.6.4.1. Resistência a meticilina/oxacilina em *Staphylococcus aureus*

As taxas de resistência à meticilina (oxacilina) em *S. aureus* têm sido bastante variadas nos últimos anos (Marra *et al.,* 2011; Sievert *et al.,* 2013; Usery *et al.,* 2014). O gene *mecA*, presente em amostras MRSA, codifica PBP alterada (PBP2a), que apresenta baixa afinidade pela penicilina e por beta-lactâmicos em geral. Portanto, a proteína permanece capaz de manter a atividade de transpeptidase, necessária à formação de ligações cruzadas na parede celular bacteriana. O gene *mecA* encontra-se inserido no cromossomo, em um elemento genético móvel chamado cassete cromossômico estafilocócico *mec* denominado SCC*mec* (*staphylococcal cassete chromosome mec*) e é conservado entre as linhagens de *S. aureus* (Katayama *et al.,* 2000).

Foi estimado que infecções por MRSA, afetou mais de150 mil pacientes por ano na União Européia (UE), o que resultou em custos adicionais em torno de 380 milhões de euros para os sistemas de saúde da UE. Dados de vigilância de ICS, mostram variabilidade de MRSA, entre os estados membros da UE, que vão desde menos 1% para mais de 50%, com redução nos países da UE com taxas endêmicas de infecções por MRSA, observada no decorrer dos últimos anos do trabalho. Na Inglaterra houve 62% de redução de MRSA em ICS, na França e Bélgica, 30% (Köck *et al.,* 2010).

No Brasil, *S. aureus* foi o principal patógeno causador de ICS em 16 hospitais distribuídos nas cinco regiões geográficas, onde 43,3% destas infecções foram causadas por linhagens MDR (Marra *et al.,* 2011). Os MRSA representam mais de 50% de ICS por *S.*

aureus, nos EUA, apresentando poucas opções terapêuticas, consequentemente elevada mortalidade e maior permanência em hospitais e elevados custos (Sievert *et al.,* 2013). Usery e colaboradores revisaram prontuários de pacientes que tiveram bacteremia com MRSA (n=122), entre junho de 2008 a novembro de 2010. O tratamento com daptomicina (n=53) e vancomicina (n-54) apresentou a mesma eficácia clínica, entretanto a terapia com linezolida (n=15) foi associada a maior taxa de mortalidade (Usery *et al.,* 2014).

Um estudo realizado na Índia 80% de todas as ICS coletadas por um ano foi atribuído a *S.aureus,* que apontou que 54% das amostras eram MRSA, com 27% de casos fatais (Eshwara *et al*., 2013). Além de IRAS, novas linhagens de MRSA surgiram como patógenos humanos na comunidade e estavam associada a pecuária na maioria dos estados membros da UE, resultando em prioridades de saúde pública a prevenção e o controle de MRSA (Köck *et al.,* 2010; Shore *et al*., 2011). Uma linhagem de *S.aureus* inicialmente conhecida como MRSA CC130 e apresentava um gene homólogo ao *mecA,* denominado mecALGA251, renomeado recentemente como *mecC* (Ito *et al.* 2012), vem sendo recuperado de pacientes em alguns países da Europa (Petersen *et al.,* 2013), sendo necessário testes moleculares específicos.

2.6.5. *Enterococcus* spp.

Os enterococos resistentes a vancomicina (VRE), representam grande problema na assistência hospitalar, com dificuldades terapêuticas e de controle ambiental, pois colonizam trato gastrintestinal e são capazes de sobreviver no ambiente por tempo prolongado sobrevivendo a dessecação e aquecimento. A presença de VRE em hospitais ao redor do mundo é uma realidade e muitas vezes têm sido descrito na forma de epidemias em diversos países e também em casos isolados de ICS (Neuman *et al.,* 1998). A transmissão do VRE ocorre principalmente através das mãos de profissionais de saúde e contato com equipamentos ou superfícies contaminadas. Pode persisitir em superfícies secas por dias ou meses, facilitando sua disseminação entre pacientes, trabalhadores da área da saúde e equipamentos.

2.6.5.1. Importância dos *Enterococcus* spp. resistentes a vancomicina

Pacientes colonizados com VRE podem desenvolver graves infecções. A idade avançada, gravidade da doença, hospitalização prolongada, cirurgia gastrointestinal, uso de cateteres venosos e forte exposição a largo espectro de ANTs, são fatores de risco para colonização e infecção com VRE. Desde a primeira identificação nos EUA, os VRE tornaram-se importantes patógenos hospitalares, em todo o mundo (Willems *et al.,* 2007). No Brasil, o primeiro VRE foi identificado em 1996, sendo *E. faecium*, portador do gene

vanA, em um hospital de Curitiba, em paciente com diagnóstico de meningite (Zanella *et al.,* 1999).

Carreadores assintomáticos na população saudável são mais comuns na Europa, em relação aos EUA atribuído a diferentes fatores. Na Europa o uso frequente da avoparcina (um análogo da vancomicina) como promotor de crescimento, utilizada em criações animais até 1997, foi responsável por muitos portadores saudáveis na comunidade, que tiveram contato próximo com esses animais (Stobberingh *et al.,* 1999). Entretanto nos EUA, onde os glicopeptídeos não foram usados em larga escala na indústria animal, a colonização por VRE entre indivíduos saudáveis foi considerada infrequente e são linhagens genéticas diferentes de *E. faecium* em três continentes (EUA, Europe e Austrália) caracterizadas pela resistência a ampicilina. Esse achado pode explicar o surgimento de cepas de VRE resistentes a ampicilina, sem a presença de reservatórios na comunidade (Willems *et al.,* 2007). A sensibilidade a ampicilina em VRE na Europa pode ter contribuído para a baixa prevalência em alguns hospitais europeus. Outro importante fator foi o uso indiscriminado de vancomicina nos EUA, como terapia nas infecções por MRSA (Kirst *et al.,* 1998).

Os pacientes infectados/colonizados se encontram frequentemente nas unidades de transplante, unidades oncológicas e principalmente CTI. No Brasil alguns estudos prospectivos em CTI, mostram taxas entre 14 e 25% de colonização retal por VRE, em geral em pacientes com uso prévio de ANT (vancomicina) e com história de longa permanência hospitalar. Relatos de casos de VRE na comunidade, também é uma realidade (Neuman *et al.,* 1998).

Os VRE apresentam diferentes genótipos sendo o *vanA* e *vanB* considerados os mais importantes no ambiente hospitalar, devido a possível transferência por conjunção, que pode ocorrer via plasmídeos ou transposons. A transmissão horizontal de transposons ocorre de modo frequente entre diferentes cepas da mesma espécie, mas pode ocorrer entre diferentes espécies do mesmo gênero. O risco desta transmissão ocorrer entre diferentes gêneros acarretando um problema ainda maior na epidemiologia das IRAS. Em um estudo para verificar a prevalência dos genes *vanA, vanB* e *vanC,* entre VRE em um grande hospital de São Paulo, Brasil, os resultados mostraram *vanA* em 43 linhagens de *E. faecalis* e somente em 5 de *E. faecium* (Caiaffa Filho *et al.,* 2003).

Outras espécies de VRE podem causar ICS, no Brasil o primeiro caso de VRE por *Enterococcus gallinarum* além de apresentar o gene característico da espécie o *vanC*, que e responsável pela baixa resistência intrínsica a vancomicina, apresentou também o gene *vanA*. Esta associação de genes podem representar uma ameaça adicional para o controle de infecções, reforçando medidas rigorosas de controle, porque bactérias que geralmente

nao requerem vigilância podem funcionam como reservatórios de genótipos de resistência incomuns (Merquior *et al.,* 2008).

As linhagens de VRE surgiram e se espalharam rapidamente pela Europa e pelos EUA desde 1988. A incidência de VRE aumentou dramáticamente na Austrália desde 1996 (primeiro isolado de VRE ocorreu em 1994) e estudos mostraram que a epidemiologia é diferente de outros lugares como Europa e EUA, predominando o *E. faecium* com *vanB,* com linhagens policronais (Bell *et al.,* 1988). Um estudo em 17 instituições com linhagens de *Enterococcus* spp. causando doenças infecciosas, mostrou que a prevalência de VRE (*E. faecium*) dobrou (7.2% em 2005 para 15.4% em 2007) (Griffin *et al.,* 2012).

Nos EUA, os dados do NHSN, entre 2007–2010, as linhagens de VRE em ICS associados a cateter venoso central (CVC), continuam sendo *E. faecium* (aproximadamente 82%), seguido de *E. faecalis* (Sievert *et al.,* 2013). Em outro estudo, a presenca de VRE tambem foi alta. Em 111 pacientes com ICS por enterococos em uso de CVC, houve 45 (40,5%) de infecções provocadas por *E. faecalis* (22% resistentes à vancomicina), 61(55%) de *E. faecium* (93% resistente à vancomicina) e 4,5% por outras espécies de enterococcus. Menores taxas de mortalidade, mostram que a retenção do CVC, foi um preditor independente de mortalidade. Os pacientes com CVCs removidos apresentaram menores taxas demortalidade 18,3% versus 37,9% dos não removidos (Marschall *et al.,* 2013).

Um estudo recente retrospectivo nos EUA, em Detroit Medical Center, 225 casos de ICS por VRE foram revistas, sendo 86 (38.2%) casos de *E. faecalis* VRE e 139 (61.8%) de *E. faecium* VRE. Três maiores classes de ANTs foram analizadas: daptomicina, linezolida e beta-lactamicos. Não houve taxa significativa de mortalidade entre os grupos, apresentando similar eficácia no tratamento de VRE (Hayakawa *et al.,* 2014).

Um estudo retrospectivo realizado na Turquia, com pacientes com doenças hematológicas colonizados com VRE (n=50), 4% desenvolveram bacteremia, mesmo com medidas de controle adequadas (Gedik *et al.,* 2014). A probabilidade de aquisição hospitalar de VRE varia com o tempo, com o ambiente (pressão de colonização) e com a duração da internação. Acredita-se que o uso de ANTs também possa predispor o surgimento de VRE pela competição da microbiota intestinal. Estudos epidemiológicos identificaram uso prévio de vancomicina como fator de risco para colonização e infecção por VRE (Carmeli *et al.,* 1999). A transferência do gene *vanA* de *Enterococcus* para *Staphylococcus* parece ocorrer de forma consideravelmente lenta, porém o uso continuado de vancomicina poderia acelerar a seleção de amostras resistentes (Rossi *et al.,* 2014).

2.7. Identificação bacteriana

O objetivo principal da microbiologia clinica é estabelecer diagnósticos indicando o melhor tratamento possível das doenças infecciosas para os pacientes e prevenir o contágio

destes microrganismos para outras pessoas. Portanto três são as principais finalidades: comprovar a presença dos microrganismos causador da infecção, identificar o microrganismo e liberar o mais rápido possível a informação necessária para a terapia apropriada, porque tanto a morbidade quanto a mortalidade podem ser significativamente reduzidas quando o diagnóstico for rápido e preciso.

A diferenciação bacteriana baseia-se primariamente na presença ou ausência de diferentes enzimas codificadas pelo material genético do cromossoma bacteriano. Essas enzimas atuam no metabolismo das bactérias ao longo de diversas vias que podem ser detectadas por meios de cultura especiais utilizados em técnicas *in vitro.* Os substratos com os quais essas enzimas podem reagir são incorporados no meio de cultura, juntamente com um indicador capaz de detectar a utilização do substrato ou a presença de produtos metabólicos específicos (Koneman *et al.,* 2008).

2.7.1. Métodos fenotípicos convencionais

São baseados no perfil bioquímico, permitem a identificação da maioria das linhagens (24-48h), com boa acurácia, porém podem levar dias para a conclusão e nem sempre são suficientes. Em alguns casos a confirmação e a classificação de agentes enteropatogênicos, são necessárias as provas sorológicas. Muitos BGN-NF apresentam diferentes morfotipos, limitações de reações bioquímicas levando a identificações errôneas, que ocorrem frequentemente quando as técnicas fenotípicas clássicas são utilizadas. Além do mais, precisa de profissionais experientes e pode ser um processo longo e difícil, com as frequentes revisões dos esquemas taxonômicos, podendo ter um atraso crucial no tratamento adequado para o microrganismo em questão e aumento o risco de mortalidade (McConeghy *et al.,* 2013).

Numerosos aspectos fisiológicos ou bioquímicos têm sido utilizados para a identificação e classificação das bactérias. Os microrganismos podem apresentar uma imensa variação em sua capacidade bioquímica. Quase toda substância orgânica pode servir como substrato para um determinado microrganismo. Dentro de uma espécie, no entanto, somente algumas reações são 100% positivas ou negativas, levando a dificuldades na identificação final pelos métodos convencionais. Por isto, sistemas modernos automatizados e atualizados, são necessários, porque estes sistemas não trabalham com decisões dicotômicas, mas com valores numéricos (estatísticos).

2.7.2. Identificação bacteriana automatizada por VITEK®2 *Systems*

No laboratório de rotina, algumas espécies bacterianas e gêneros, são difíceis de serem identificadas e podem levar muitos dias para a liberação do laudo. Metodologias automatizadas, apesar de caras, também requerem horas para a identificação (Seng *et al.,*

2009), porém são imprescindíveis, porque identificam na maioria dos casos, o agente infeccioso mais rápido que provas bioquímicas manuais, que em muitos casos não são suficientes. Os sistemas VITEK®2 *Systems* identificam um microrganismo com uma metodologia que utiliza métodos bioquímicos baseados em substratos que medem a utilização da fonte de carbono, atividade enzimática e resistência a ANT. Isto ocorre através das características dos dados e no conhecimento sobre o microrganismo e as reações analisadas (Wallet*et al.,* 2005). Nos sistemas VITEK®2, os painéis para a identificação dos BGN-F e BGN-NF, contém 47 testes bioquímicos (Funke e Funke-Kissling, 2004). Os resultados finais estão disponíveis em até 10 h, após o crescimento e isolamento do agente etiológico das ICS, que leva geralmente 12 a 24 h. Para a identificação dos CGP, os painéis contêm 43 testes bioquímicos e os resultados finais estão disponíveis em até 8 h. As reações ocorridas quando comparadas com as reações típicas de cada microrganismo, geram um percentagem de probabilidade, onde valores perto de 99 indicam uma correspondência mais próxima do padrão típico, para o microrganismo em questão (Funke e Funke-Kissling, 2005).

2.7.3. Identificação bacteriana por MALDI-TOF MS

O MALDI-TOF MS surgiu no final de 1980, como uma técnica para investigar a massa molecular de compostos orgânicos, através de uma ionização suave. Esta ionização ocorre através da incidência de um feixe de laser de nitrogênio, sobre a amostra recoberta por uma matriz, resultando uma fragmentação mínima das moléculas analisadas (Tanaka *et al.,* 1988).

2.7.3.1. Descrição técnica

No sistema MALDI-TOF MS os microrganismos são colocadas em uma placa metálica e recobertas por uma matriz orgânica. As matrizes são geralmente compostos químicos, que contenham unidades aromáticas que transferem a energia absorvida a partir da fonte de irradiação (laser), para as moléculas da amostra, resultando em fragmentação mínima. Eles são utilizados como uma solução líquida, denominada "solução matriz" e a sua composição final é constituída pelo composto químico que é a matriz, dissolvida num solvente orgânico, geralmenteo etanol e/ou acetonitrilo e água (Santos e Lima, 2010a; Hillenkamp e Peter-Katalinic, 2014). A escolhada matriz apropriada para a identificação dos microrganismos é importante porque depende do comprimento de onda do laser utilizado no equipamento MALDI-TOF MS (Simões *etal.,*2013b).

O ácido 2,5-di-hidróxi-benzóico (DHB) ou o ácido α-ciano-4-hidroxi-cinâmico (CHCA), que tem absorção máxima em um comprimento de onda entre 337 e 353 nm, são exemplos de matrizes bastante empregadas. A relação molar matriz/analito deve estar

compreendida entre 100:1 e 50000:1 (Hillenkamp e Karas, 1991; Santos *et al.,* 2010; Santos e Lima, 2010a; Santos *et al.,* 2011). O excesso da matriz conduzirá a um processo de cristalização acentuado da amostra, o que fará com que o analito seja incorporado pela matriz.

O processo de desabsorção/ionização ocorre pela incidência de um feixe de um laser, geralmente o UV, que opera em um determinado comprimento de onda, sobre a mistura matriz/analito, convertendo em energia térmica, gerando uma explosão. A matriz saturada é capaz de absorver a radiação na região do espectro onde o laser atua. Inicialmente, a energia do laser incide sobre a matriz, que está presente em excesso na amostra, conduzindo a um processo de cristalização acentuado da amostra, formando um tapete de pequenos cristais de diferentes tamanhos. Uma pequena parte da matriz aquece-se rapidamente e é vaporizada (frações de nanosegundos). Essa energia recebida pela matriz é transferida, num processo de desabsorção, para as moléculas do analito, que são assim ionizadas. A amostra irradiada pelo laser vai sofrer uma explosão e ao mesmo tempo uma ionização suave das moléculas, evitando a degradação das proteínas, que serão usadas no processo de identificação como biomarcadores.

Do impacto da explosão, as moléculas ionizadas são aspiradas e alinhadas, dentro de uma zona submetida a um campo magnético, de acordo com a razão massa/carga (m/z). Em função dessa razão m/z íons com carga são gerados com diferentes pesos (vários tamanhos). A medida que a diferença de potencial é constante no que diz respeito a todos os íons, eles são direcionados a um detector, uma zona isenta de campo magnético, chamada "tubo de tempo de voo" ou "zona de deriva", onde são separados apenas em função das massas moleculares individuais. Os íons mais leves que tem menor valor de m/z se movem mais rapidamente em relação aos íons altamente carregados, através do espaço até que atingem o detector. Por conseguinte, o tempo de vôo (TOF-*time of flight*), destes íons vai diferir de acordo com a proporção de sua massa/carga (m/z), ou seja, o tamanho da molécula (Pasch e Schrepp, 2003; Santos e Lima, 2010a; Santos *et al.,* 2011; Shimadzu Corporation, 2013).

Esta técnica baseia-se na análise e detecção de moléculas em uma gama de massas entre 2.000-20.000 Da, produzindo uma impressão digital específica, sendo necessária a utilização no modo linear do equipamento, que tem comprimento suficiente para a separação protéica, gerando espectros sem ruídos (Kallow *et al.,*2006; Santos e Lima, 2010a). As proteínas ribossomais são proteínas abundantes que aparecem nesta faixa de massa específica, podendo ser utilizadas como biomarcadores. Neste caso, o interesse da técnica em questão é a análise das células intactas, onde o espectro gerado é interpretado como *fingerprint* (impressões digitais) (Santos *et al.,* 2010).

Autores relatam que na análise de rotina, o uso do MALDI-TOF MS apresenta vantagens sobre o teste genotípico PCR, por ser um método rápido, prático e de baixo custo laboratorial, partindo da aplicação direta da colônia do microrganismo em placa de cultivo, uniformemente misturada numa grande quantidade de matriz até que se cristalize. Cada amostra é aplicada em uma área circular delimitada (*spots*) de uma placa de aço inoxidável específica para o uso em MALDI-TOF MS, podendo ser feitas várias amostras ao mesmo tempo, em poucos minutos (Santos *et al.,* 2010; Simões *et al.,* 2013a).

Os métodos habitualmente empregados para a preparação das linhagens bacterianas para a análise de MALDI-TOF MS são: o método direto da colônia e o método de extração. O método direto envolve tocar uma colônia individual na placa de cultivo utilizando um palito ou algo semelhante (ponta de uma ponteira). Embora este seja o método mais rápido e fácil, gerando uma resolução espectral suficiente para a identificação na rotina, da maioria das linhagens bacterianas, a ruptura física do peptidoglicano na parede celular da bactéria GP, utilizando este método, pode não ser ideal para a preparação adequada de proteínas para análise por MALDI-TOF MS. A transferência direta de uma colônia a partir de uma placa de ágar, pode também reduzir a resolução do espectro obtido devido a metabólitos, pigmentos, e/ou o ágar interferir no processo de cristalização (Bizzini *et al.,* 2010).

O método de extração envolve a lise das células bacterianas, liberando-se um extrato de proteínas, que quando aplicado sobre a placa para a análise de MALDI-TOF MS, supera a desvantagem do método da colônia direta. Esta preparação da amostra pode ser útil para aumentar o número total de picos e a qualidade do espectro. A identificação bacteriana por MALDI-TOF MS com base em uma metodologia com a preparação prévia da amostra para a purificação mínima de conteúdo da célula, desenvolvida por Caine colaboradores, foi um marco importante para o uso da técnica de MALDI-TOF MS em taxonomia de fungos (Cain *et al.,* 1994). Foi demonstrado que a extração previa da proteína, melhorou o rendimento geral nos microrganismos estudados, passando de 70,3% para 93,2 (Bizzini e Greub, 2010).

Comparando as metodologias para o preparo da amostra com a aplicação direta ou por extração foram avaliadas por MALDI-TOF MS, 305 linhagens de *Stapylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. e gêneros correlacionados, que foram previamente identificados por testes fenotípicos e/ou sequenciamento do 16S rRNA. Foram excluídos 7 linhagens que não se encontravam no banco de dados do sistema. O MALDI-TOF MS, identificou corretamente utilizando o método da extração, 95% dos gêneros (n=284) e 69% das espécies (n=207). Usando os testes com a aplicação direta da colônia este valor reduziu significantemente (56% dos gêneros (n=168) e 20% das espécies (n=60). A extração preparatória é

necessária para a identificação de uma proporção substancial dos CGP (Alatoom *et al.,* 2011).

Em um estudo, foi demonstrado que a exatidão das identificações por MALDI-TOF MS não foram afetadas quando foi usado meio de cultura distintos (ágar sangue, ágar chocolate, ágar CLED, ágar Sabouraud), com temperatura de incubação variadas (4, 30, ou 35℃), condições de incubação (O2 ou CO2 a 5%), nem o maior tempo incubação (até 72 h). O pré-tratamento das leveduras foi essencial para a correta identificação. Quando BGN-NF tiveram uma pontuação baixa, com apenas a identificação de gênero (<2,0) ou não identificação (<1,7), o pré-tratamento aumentou o nível de identificação em 37%. Em geral, o pré-tratamento não foi necessário para as bactérias GP e *Enterobacteriaceae* (van Veen *et al.,* 2010). Bizzini e colaboradores obtiveram 25% a mais de validação do resultado com a extração protéica (Bizzini *et al.,* 2010). Outro estudo, comparando estes dois métodos para identificação dos CGP (incluindo enterococos), mostrou que o método de extração, foi superior para a identificação do gênero e das espécies (Alatoom *et al.,* 2011).

A calibração do MALDI-TOF MS pode ser realizada usando proteínas bem caracterizadas a partir de *E. coli* (Ryzhov e Fenselau, 2001). Entre dezenas de proteínas ribossomais de células intactas de *E. coli,* doze proteínas bem definidas são usadas como padrão por MALDI-TOF MS (4.365,4; 5.096,8; 5.381,4; 6.241,4; 6.255,4; 6.316,2; 6.411,6; 6.856,1; 7.158,8; 7.274,5; 7.872,1; 9.742 e 12.227,3 Da). Devido ao procedimento simples e de baixo custo em se obter *E. coli* com 24h de crescimento e a confiabilidade encontrada em seus biomarcadores, faz com que a *E. coli,* seja a bacteria de primeira escolha para as empresas fabricantes do equipamentos e *software*, com o propósito de identificação microbiana.

O MALDI-TOF MS para a identificação e classificação dos microrganismos precisa de *software* e de um banco de dados para permitir comparações da proteína desconhecida com massa molecular de referência, que geralmente são as proteínas ribossomais (50 a 70%), usadas como massas moleculares de referência, pois serem as mais abundantes nas células. No espectro de massa desses biomarcadores, é importante apenas a presença ou ausência dos picos referentes aos referidos biomarcadores. As intensidades dos picos (concentrações) não são relevantes no processo de identificação. Cada espectro obtido é comparado com espectros de referências existentes em bancos de dados, que contém um grande número de espectros de espécies de relevância clínica, incluindo microrganismos aeróbios, anaeróbios, micobactérias, leveduras e fungos filamentosos (Lima *et al.,* 2008; Bizzini *et al.,* 2010; Pereira *et al.,* 2010; Santos e Lima, 2010a; Veloo *et al.*, 2011; Santos *et al.,* 2011; Pereira *et al.,* 2013). Os agrupamentos entre esses espectros são finalmente baseados em dados estatísticos, tais como Análises de Componentes Principais (ACP) (Santos *et al.,* 2010).

Apesar de várias vantagens já apresentadas para identificação por MALDI-TOF MS, os investigadores concluiram que é necessário um banco de dados mais amplo e preciso, para uma pequena classe de microrganismos. Para os BGN anaeróbios como *Fusobacterium nucleatum* (n=46), mais que 50% das linhagens, as identificação não foram concluídas. Os enterococos e os estreptococos beta hemolíticos foram corretamente identificados por MALDI-TOF MS, porém estreptococos do grupo viridans e pneumococos revelou muitos erros de identificação. Quase 50% dos isolados de *S. pneumoniae* foram identificados incorretamente como *Streptococcus* para *sanguinis* porque o banco de dados incluiu apenas três *S.pneumoniae* e dois espectros de referência S.*parasanguinis* (Seng *et al.,* 2009). Embora o custo inicial para adquirir um espectrómetro de massa é relativamente alto, o custo de identificar uma espécie de microrganismo permanece baixa, em comparação com o custo de técnicas padrão de biologia molecular ou testes bioquímicos. O processo de diagnóstico com MALDI-TOF MS, é de aproximadamente, 24 h mais curto (Wieser *et al.,* 2012).

2.7.3.2. Importância da *i*dentificação por MALDI-TOF MS

A técnica de MALDI-TOF MS tem dado um grande contributo para o conhecimento científico na identificação de grupos de microrganismos conhecidos, de difícil identificação, ou até mesmo ainda não descritos para a ciência, na área de análises clínicas, alimentar ou ambiental (Santos, 2011; Santos *et al.,* 2011, Simões *et al.,* 2013b; Lima-Neto *et al.,* 2014). O número de espécies de fungos subestimado é de 1,5 milhões e apenas um número pequeno foi identificado (cerca de 8-10%) (Hawksworth, 2001).Vários estudos têm sido realizados para preencher a grande lacuna entre a riqueza das variedades das espécies de fungos conhecidas e as estimadas (Santos *et al.,* 2009; Simões *et al.,* 2013a).

Essa técnica já tem sido utilizada como uma ferramenta eficaz para testes rápidos em análises clínicas, não só para microrganismos aeróbios, mas também anaeróbios (Lima *et al.,* 2008; Seng *et al.,* 2009; Bizzini *et al.,* 2010; Pereira *et al.,* 2010; Santos *et al.,* 2010; Santos e Lima, 2011; Vello *et al.,* 2011; Vello *et al.,* 2014). Além do mais, já foi demonstrado que o MALDI-TOF MS tem boa acurácia para identificar bactérias fastidiosas e nutricionalmente dependentes, quando comparado com o sistema VITEK®2 levando benefício aos cuidados do paciente (Ratcliffe *et al.,* 2013). O MALDI-TOF MS teve um desempenho significativamente melhor do que os métodos automatizados como o VITEK®2, galeria de identificação API *Analytical Profile Index* (bioMérieux) e testes bioquímicos, para a identificação das espécies de estafilococos e identificação de bactérias pertencentes ao grupo HACEK (*Haemophilus, Actinobacillus, Cardiobacterium, Eikenella* e *Kingella*) (van Veen *et al.,* 2010).

Com a introdução de MALDI-TOF MS na rotina laboratorial, muitos dos SCN podem ser identificados a espécie, que pode ser muito útil, podendo ajudar a diferenciar culturas contaminadas de verdadeiras infecções (von Eiff *et al.,* 2002). No laboratório de rotina, de um modo geral, a cultura para fungos são necessários de 30 a 45 dias para a apresentação dos resultados. A partir do crescimento ideal do fungo, este tempo pode ser reduzido a cinco minutos. Simões e colaboradores relatam que no laboratório da Micoteca da Universidade do Minho (MUM), no processo de identifição polifásica dos fungos, a primeira metodologia utilizada é a morfologia, com caracterização micro e macroscópica, seguido de exames bioquímicos e análise espectral por MALDI-TOF MS. Devido aos custos e demora dos resultados, a biologia molecular é normalmente utilizado como a última metodologia na abordagem polifásica proposto no laboratório de MUM (Simões *et al.,* 2013a).

Recentemente, Vello e colaboradores, tiveram como objetivo estudara influência do tempo de incubação, a exposição ao oxigênio e preparação de amostras de bactérias anaeróbicas sobre a qualidade do espectro. A taxa de crescimento e a sensibilidade oxigênio diferem entre elas. Vinte e seis espécies de anaeróbios, representando 17 gêneros, foram selecionados com base em características da coloração de gram, taxa de crescimento e morfologia da colônia. A influência do tempo de incubação foi determinada depois de 24 até 96 horas de incubação. A identificação de espécies foi confiável após 48 horas de incubação para os anaeróbios GN e depois de 72 horas para os anaeróbios GP. A Exposição das culturas ao oxigênio não influenciou os resultados das identificações por MALDI-TOF MS de todas as espécies GP testadas, representando uma grande aplicabilidade da técnica. Apenas o *Fusobacterium necrophorum* e *Prevotella intermedia* não foram identificados após 24 horas de exposição ao oxigênio, respectivamente. Outras bactérias GN testadas puderam ser identificadas após 48 horas de exposição ao oxigénio (Vello *et al.,* 2014). Estes dados acima mostram a importância desta tecnologia na identificação de anaeróbios, que não são incluídos na rotina de um laboratório de análises clínicas por requererem condições especiais de anerobiose e dificuldades na sua identificação.

Numa avaliação da performance do MALDI-TOF MS, pesquisadores utilizando 327 microrganismos identificados por técnicas convencionais (VITEK®2, API, e testes bioquímicos), 95,1% foram identificados corretamente o gênero bacteriano e 85,6% a espécie. As discrepâncias foram analisados por sequenciamento do 16S rRNA. Em outra avaliação prospectiva, incluindo 980 (bactérias e leveduras), o desempenho geral da MALDI-TOF MS para a identificação correta da espécies, foi significativamente melhor do que os sistemas convencionais (92,2% e 83,1%, respectivamente), observada em 97,7% das *Enterobacteriaceae*, 92% dos BGN-NF, 94,3% dos estafilococos e 84% estreptococos. O MALDI-TOF MS, produziu menos identificações incorretas para o gênero (0,1% e 1,6%,

respectivamente). A não identificação de algumas linhagens por MALDI-TOF MS, foram claramente associadas com a falta de espectros, a partir de estirpes de referência, no banco de dados de MALDI-TOF MS (van Veen *et al.,* 2010).

Em outra avaliação com 1.181 amostras analisadas (1.061 bactérias e 120 isolados de leveduras), 99,5% foram corretamente identificados por MALDI-TOF (95,7% das espécies, 3,6% somente o gênero). Apenas, 0,1% das leveduras foram identificadas erroneamentes e 0,4% não foram identificadas (as espécies não estavam incluídos no banco de dados) (Wang *et al.,* 2014). Estes dados acima representa um importante avanço no laboratório de microbiologia clínica, visto que a identificação das espécies de *Candida* spp. *não albicans*, são uma tarefa árdua para o laboratório de rotina e em muitos casos não se identifica a espécie. Klein relatou em um estudo realizado no HUCAM, uma marcante mudança na distribuição das *Candida* spp. *não albicans*, chegando a 74% dos isolados em 2005, confirmando a importância dessas espécies, que diferem em sua patogênese e virulência, além de apresentarem perfil de susceptibilidade peculiar a antifúngicos, característico das espécies (Klein, 2006).

Outro estudo com 1371 microrganismos identificados por métodos convencionais, MALDI-TOF MS apresentou 93,2% dos microrganismos (n=1278), com score $x \geq 2,0$ (precisa identificação). Entre estes resultados válidos, 95,1% (n=1216) tiveram a mesma identificação dos testes convencionais. Resultados discordantes foi observado em 63 microrganismos e destes 7 tiveram sua identificação inicial errada por métodos convencionais. Os outros 56 microrganismos, a discordância entre as identificação, foi principalmente devido a taxonomia inapropiada no banco de dados do MALDI-TOF MS. Apenas três *Shigella* foram identificadas como *E. coli*, no MALDI-TOF MS. As discordâncias taxônomicas podem facilmente serem corrigidas pelo *update* da data base, pela correção automática dos sistemas ou pelo microbiologista (Bizzini *et al.,* 2010).

Avaliando o desempenho do MALDI-TOF MS em relação ao VITEK®2 para a identificação de microrganismos na rotina, em 1025 microrganismos (55 espécies de 25 gêneros), o MALDI-TOF MS apresentou menos erros (5,56%) de identificação para as espécies (VITEK®2 foi de 6,24%) e não teve erros na identificação dos gêneros (VITEK®2 teve 0,58%). O MALDI-TOF MS teve um excelente desempenho com 99,6% de precisão dos gêneros identificados e 93,37% das espécies, mostrando ter potencial para substituir métodos fenotípicos convencionais, além de não requerer dias para concluir a identificação como nos testes convencionais (Guo *et al.,* 2014).

Recentemente Zhou e colaboradores, comparando métodos tradicionais de identificação usando sitema automatizado Phoenix *System* (BD Company, Franklin Lakes, USA), com MALDI-TOF MS, em 876 microrganismos (52 espécies de 27 gêneros), identificados pelo sequenciamento do 16S rRNA, o desempenho do MALDI-TOF MS, foi

significativamente melhor do que o método automatizado, para a identificação das espécie corretas (94,7% versus 85,2%, respectivamente) (Zhou *et al.,* 2014a).

Aplicar metodologias para encurtar o tempo de identificação do patógeno e oferecer resultados mais rápidos para os clínicos continuam sendo as questões mais importantes para ser resolvido no laboratório de análises clínicas. Isto significa tratar os pacientes mais rápidamente, reduzir as taxas de mortalidade, o tempo de permanência do paciente internado e os custos de saúde associados com o atendimento ao paciente. Os métodos moleculares são comprovadamente considerados padrão ouro na identificação bacteriana, mas não são práticos para o uso rotineiro devido aos seus procedimentos complicados e alto custo. O MALDI-TOF MS oferece uma solução promissora para encurtar o tempo de resposta do exame microbiológico e aliviar as pressões exercidas pelos clínicos e as bactérias com o uso inadequado de ANTs.

O MALDI-TOF é uma tecnologia que tem sido aplicada com sucesso, como um processo de identificação rápida dos microrganismos e tem sido amplamente utilizado na prática laboratorial de rotina devido aos benefícios econômicos de diagnóstico e está evoluindo rapidamente na utilização desta tecnologia para aplicações mais definidas, incluindo a identificação da resistência aos ANTs, mostrando-se uma solução promissora.

2.7.3.3. Detecção da resistência antimicrobiana por MALDI-TOF MS

A resistência das bactérias aos ANTs tem aumentado nos últimos anos e tem complicado significativamente o tratamento de infecções em pacientes críticos, especialmente os do CTI e imunocomprometidos (Livermore, 2012; Nordmann*et al.,* 2012). A resistência a todos ANTs também tem sido descrita, tornando a grande preocupação mundial (Tzouvelekis *et al.,* 2012; Hrabák *et al.,* 2011).

O surgimento de novos mecanismos de resistência pelos microrganismos a diferentes ANTs criaram uma tarefa dinâmica e desafiadora para o laboratório de microbiologia clínica. No laboratório de rotina a detecção do mecanismo de resistência é complementar aos procedimentos de TSA, levando no mínimo, mais 24h para a liberação do resultado final. Portanto, os laboratórios de rotina também precisam de métodos rápidos e confiáveis para detectar os principais mecanismos de resistência, que desempenha um papel chave para orientar nas opções terapêuticas oportunas na gestão das doenças infecciosas decorrentes de infecções bacterianas.

As técnicas atuais empregadas para a identificação e detecção dos principais mecanismos de resistência, incluem métodos fenotípicos ou moleculares demorados e trabalhosos, que exigem equipamentos e materiais de consumo caro e pessoal altamente treinado. A susceptibilidade antimicrobiana tem sido classicamente determinada utilizando uma variedade de métodos *in vitro*, tais como a difusão de disco, microdiluição em caldo e

métodos baseados em instrumentos automatizados. Usando esses métodos, o relato de CIMs e interpretações podem levar entre 24 a 96 h, após ser obtida uma cultura pura do patógeno. Infelizmente, os resultados para alterar a terapia antimicrobiana em microrganismos não susceptíveis, obtidos após 48 h, aumentam muito a mortalidade e podem ter pouco valor clínico (Kang *et al.,* 2005). O uso de tecnologias alternativas capazes de produzir resultados mais oportunos é o foco atual dos pesquisadores.

O controle de bactérias MDR tornou-se exaustivo no âmbito hospitalar e com custos crescentes sobre os recursos da saúde. O emprego de testes rápidos também tem a capacidade para reduzir significativamente a propagação dos microrganismos, que tem a capacidade de colonizar os pacientes durante longos períodos. A detecção rápida de MRSA, VRE, enterobactérias produtoras decarbapenemases, também é de grande importância para a prevenção eficaz da transmissão destas bactérias (Griffin *et al.,* 2012).

Além disso, também foi demonstrada a utilização de MALDI-TOF MS, para determinar a relação entre os isolados que contribuem para um surto. Os métodos de tipagem genotípicos atualmente empregados incluem PFGE e MLST. Embora estes métodos tenham alto poder discriminatório, eles são caros e com prazos longos para a liberação dos resultados, que limitam a sua utilização clínica no laboratório de rotina. A velocidade do MALDI-TOF MS em analisar bactérias isoladas não apenas para fins de identificação, mas também o potencial de parentesco entre elas torna uma alternativa atraente em relação aos métodos genotípicos. Além de *S. aureus,* o MALDI-TOF MS mostrou potencial de se tornar linha de frente no controle de infecção devida a rápida identificação de MRSA (Wolters *et al.,* 2011), temos exemplos de outras aplicações para este fim que incluem: a tipagem de espécies de *Listeria* (Barbuddhe *et al.,* 2008), a diferenciação de *Streptococcus pneumoniae* isolados associados com um surto de conjuntivite (Williamson *et al.,* 2008), e enterobactérias produtoras de carbapenemase (Lau *et al.,* 2014).

Em um estudo realizado para explorar o poder discriminatório do MALDI-TOF MS, em linhagens isogênicas de *S.aureus* MRSA, mostrou alterações em espectros de massa entre linhagens sensíveis e resistentes a teicoplanina, mesmo quando eram indistinguíveis ou apresentavam pequenas modificações por PFGE. O MALDI-TOF MS mostrou ter potencial de descriminação superior a esta tecnologia (Majcherczyk *et al.,* 2006). Alguns autores acharam picos específicos em MRSA e MSSA e podem estar relacionados a extração do material (lise celular) (Hrabák *et al.,* 2013).

A resistência a ANTs beta-lactâmicos é um desafio cada vez maior para o gerenciamento de infecções bacterianas graves como ICS, para a escolha de uma terapia antibiótica adequada. Esta resistência é baseada principalmente na expressão ou super expressão de beta-lactamases, que destroem por hidrólise o anel beta-lactâmico. Sparbier e

colaboradores demonstraram que esta hidrólise pode ser facilmente detectada por MALDI-TOF MS depois de algumas horas de incubação de enterobactérias testadas com diferentes ANTs beta-lactâmicos: ampicilina, piperacilina, cefotaxima, ceftazidima, ertapenem, meropenem e imipenem. A comparação destes dados com os dados do procedimento de rotina em um laboratório de microbiologia clínica revelou classificação idêntica das bactérias de acordo com a susceptibilidade e resistência, entretando, os resultados foram liberados no mesmo dia. Os procedimentos no laboratório de microbiologia clínica, exigem pelo menos, um período de incubação *over night* (Sparbier *et al.,* 2012).

Os métodos mais comuns para a detecção de carbapenemases são ensaio fenotípico e molecular baseado em PCR. Cuidado na detecção de carbapenemases no laboratório de microbiologia clínica é necessário, porque CIMs altas de carbapenêmicos nem sempre são evidentes e, portanto elas podem não serem identificadas (Queenan e Bush, 2007). Desde 2011, os primeiros estudos ja mostravam a detecção direta de carbapenemase por MALDI-TOF MS, como metodologia rápida e possível (Burckhardt e Zimmermann, 2011; Hrabák *et al.,* 2011). O MALDI-TOF MS associado a um programa (algoritmo genético) "*ClinProTools"*, foi capaz de identificar BGN produtores de carbapenemase em 100% das linhagens pesquisadas classificadas como carbapenemas e positiva e negativa (Wang *et al.,* 2013).

No Brasil, um trabalho recente foi realizado com 100 frascos positivos de hemocultura selecionados aleatóriamente, para avaliar o desempenho de MALDI-TOF MS para a detecção rápidada atividade carbapenemase diretamente dos frascos de hemocultura positiva. O MALDI-TOF MS mostrou-se viável identificando 21 de 29 (72,4%) de linhagens produtoras de carbapenemase, em particular os que codificam KPC-2 (100%) e SPM-1 (100%), depois de um período de 4h de incubação. Embora a maioria dos produtores de OXA-23 em *A. baumannii,* não foi identificada no primeiro dia, no dia seguinte todos foram detectados partindo diretamente da colônia. MALDI-TOF MS pode contribuir para o reajustamento mais rápido da terapia antimicrobiana empírica e implementação de medidas de controle de infecção (Carvalhaes *et al.,* 2014).

Além dos VRE detectados na rotina, estudos mostram o aumento significante de espécies não usuais de enterococos, como *E. gallinarum, E. durans* e *E. casseliflavus* envolvidos em infecções (Willey *et al.,* 1999). Apesar de alguns apresentarem resistência intrínsica a vancomicina, não existe a mesma preocupação com o controle de infecção como existe para *E. faecium* ou *E. faecalis* VRE, visto que suas resistências são cromossomais e não mediadas por plasmídeos. Portanto, eles podem crescer nos meios de *screening* designados a VRE e estas espécies incomuns poderiam não ter uma identificação confiável em testes comerciais (Willey *et al.,* 1999) e serem liberados por falsos VRE, aumentando custos hospitalar com as medidas de contenção. A habilidade de

uma identificação rápida e correta destas espécies ira reduzir o número de falso positivo em VRE (Griffin *et al.,* 2012).

A análise de MALDI-TOF MS provavelmente em um futuro breve, pode ser aplicado para a análise de todos os mecanismos de resistência. As abordagens que já foram relatadas é baseada: na análise de moléculas dos ANTs se seus produtos modificados, na análise de componentes das células bacterianas, a análise de metilação do DNA ribossomal e a detecção de mutações com o mini sequenciamento. Com estas novas aplicações o MALDI-TOF MS pode fornecer resultados que podem ser utilizados para o diagnóstico em laboratório de rotina e não ficar apenas limitados a centros de referência e laboratórios de pesquisa (Hrabák *et al.,* 2013).

2.7.3.4. Outras aplicações em microbiologia clínica

O MALDI-TOF MS além de estar sendo aplicado em microbiologia clínica para a identificação de agentes patogénicos (Bizzini e Greub, 2010, Santos *et al.,* 2010) e a detecção de carbapenemase (Burckhardt e Zimmermann, 2011; Hrabák *et al.,* 2011), recentemente foi demonstrado uma nova aplicação deste método paraa detecção rápida de alteração de porina sem *Klebsiella* spp. mostrando ser uma técnica confiável para a detecção de peptídeos. Cai e colaboradores, foram capazes dedetectar por MALDI-TOF MS, a perda da porina OmpK36 (responsável pela penetração dos carbapenêmicos para o periplasma), que contribui paraa resistência a carbapenêmicos em *K. pneumoniae.* O MALDI-TOF MS, mostrou-se mais rápido do que o SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*), que é o método mais comum para a análise de porina, porém trabalhoso, demorado e requer grande número de amostras, não sendo prático para a rápida identificação de bactérias causadoras de infecções (Cai *et al.,* 2013).

O controle de VRE desde a sua descoberta há 20 anos, vem sendo uma tarefa exaustiva para toda a equipe de CCIH, para evitar a sua disseminação, com grande impacto nos recursos de um hospital. Na Austrália, pesquisadores relatam que MALDI -TOF MS foi capaz de identificar rapidamente e com precisão *E. faecium* VRE *vanB* positivo, que é o fenótipo mais comum neste país. A sensibilidade inicial foi de 92,4% e especificidade de 85,2%. Entretanto, com a validação prospectiva dos resultados, após incorporação desta metodologia no fluxo de trabalho na rotina labratorial, demosntrou um aumento da sensibilidade (96,7%) e especificidade (98,1%). Portanto, estes dados mostram a relevância do uso desta tecnologia no laboratório de microbiologia clínica, onde operadores foram capazes de obter resultados comparáveis aos da biologia molecular (Griffin *et al.,* 2012).

Pesquisas também têm sido realizadas para explorar o potencial do MALDI- TOF MS em tipagem de microrganismos. A diferenciação entre as espécies é importante para a análise epidemiológica. As técnicas atuais utilizadas (PCR, PFGE, MLST, entre outras)

possuem poder discriminatório diferente entre os microrganismos e seu uso depende do objetivo final. No geral, estas aplicações são muito caras, demoradas e por vezes, apresentam um baixo nível de reprodutibilidade. As diferenças entre os espectros de proteínas pode ser utilizada para tipagem de um microrganismo por MALDI -TOF MS, conforme relatado em estudos recentes em *Salmonella* (Dieckmann e Malorny, 2011), *Francisella tularensis* (Seibold *et al.,* 2010), *Bacterioides fragilis* (Nagy *et al.,* 2011), *A. baumannii* (Mencacci *et al.,* 2013), *Yersinia enterocolitica* (Stephan *et al.,* 2011) e *Cryptococcus* (Posteraro *et al.,* 2012).

O agente causador da tularemia, *Francisella tularensis*, é uma bactéria com potencial de bioterrorismo. São difíceis de serem cultivadas, demorando quase 10 dias ou mais para se desenvolverem e a diferenciação entre as espécies por métodos bioquímicos convencionais são difíceis e muitas vezes ineficientes e representam um risco significativo de contágio para o pessoal do laboratório. Portanto a diferenciação rápida da linhagem altamente virulenta de *F. tularensis* subespécie *tularensis*, da menos virulenta de *F. Tularensis* subespécie *holarctica* é de interesse clínico substancial em amostras clínicas ou amostras ambientais, mas pode ser ainda mais importante em relação ao uso potencial como um agente de guerra biológica. As linhagens virulentas e não virulentas são estreitamente relacionadas, portanto a discriminação fenotípica é difícil e muitas vezes produzem resultados demorados e não conclusivos. Como uma alternativa rápida e simples, o MALDI-TOF MS avaliou 50 linhagens deste microrganismo, para avaliar a sua capacidade de identificar e distinguir entre as linhagens de acordo com as suas espécies e subespécies. Por MALDI-TOF MS (n=45), foram totalmente discriminadas, resultando em perfeita concordância quando comparado com o sequenciamento do gene 23S rRNA. O método foi rápido (10 a 30min), não precisou de um alto nível de treinamento de pessoal e reduziu o risco de infecções associadas a manipulação laboratorial porque a quantidade de material necessário para a preparação da amostra é mínima (Seibold *et al.,* 2010).

Sistemas de identificações modernos, semi ou totalmente automatizados, como o VITEK®2, API, Phoenix (BD, Heidelberg, Germany), são amplamente utilizados em microbiologia clínica, podem ser capazes de identificar linhagens de *Francisella tularensis,* mas erros podem acontecer e não estão capacitados para discriminar entre as espécies e subespécies (Leelaporn *et al.,* 2008).

2.7.3.5. Considerações finais da técnica MALDI-TOF MS

Os vários estudos já realizados com MALDI-TOF MS (em torno de 200 até o ano de 2011), tem dado também grande contribuição à microbiologia clínica, destacando muitos benefícios com o uso desta tecnologia, mostrando que esta tecnologia tem potencial para estudos epidemiológicos e classificação taxônomica das bactérias e fungos, devido a

preparação da amostra ser simples e a análise extremamente rápida e eficaz, com a vantagem adicional de ser uma técnica com baixo custo (Bizzini *et al.,* 2010; Santos *et al.,* 2010; Santos *et al.,* 2011; Santos e Lima, 2011).

Até recentemente, os métodos convencionais para a identificação de bactérias principalmente com base em técnicas bioquímicas e fenotípicas têm prevalecido no laboratório de microbiologia clínica. Todos os métodos manuais e automatizados (métodos convencionais) são demorados e muitas vezes a identificação requer procedimentos complexos adicionais com procedimentos de periodo de incubação longos e com grandes quantidades de material biológico, que é particularmente difícil de conseguir com os microgarnismos fastidiosos e/ou com características bioquímicas atípicas. Os métodos moleculares, incluindo a caracterização taxonômica através da análise da sequência do gene ribossomal 16S rRNA, foi demonstrado que têm alto valor complementar, considerado o método mais poderoso, mas eles não são práticos para uso de rotina, devido ao seu alto custo e tempo de execução. Especialmente nos últimos cinco anos, análise realizadas com MALDI-TOF MS, foram focadas na detecção de resistência a ANT, visando analisar positivamente as perspectivas futuras neste campo, aplicadas ao laboratório de rotina microbioógica, representando um enorme avanço e com grande impacto no momento atual com o aumento elevado da resistência. Os resultados dos estudos apresentados demonstram que a MALDI-TOF MS é uma ferramenta importante para a detecção de resistência e abre novos caminhos para a microbiologia clínica e experimental.

Uma área em expansão é também o desenvolvimento de novas aplicações do MALDI-TOF MS, tais como a identificação de patógenos diretamente dos frascos positivos de hemocultura, sem ser necessária a etapa prévia do crescimento bacteriano (geralmente 24h) (Kilic e Baysallar, 2014; Hoyos-Mallecot *et al.,* 2014). Para isto é fundamental desenvolver experiência científica em grupos multidisciplinares de modo a criar competências para novos desafios da aplicabilidade desta tecnologia, na área da saúde, trazendo benefícios a todos.

O MALDI-TOF MS surgiu recentemente como uma tecnologia poderosa para a identificação de microrganismos, que é baseado na geração de espectros das proteínas, que são únicas para cada microrganismo, funcionando como impressões digitais, alterando o fluxo de trabalho de laboratórios já bem estabelecidos e seu impacto no diagnóstico microbiológico é incomparável. O MALDI-TOF MS tem a vantagem de identificar bactérias e fungos diretamente a partir de colônias que cresceram em placas de cultura, em poucos minutos e com processos simples. Nos últimos anos, numerosos estudos, envolvendo MALDI-TOF MS expandiram-se em ritmo impresionante no campo das ciências biológicas, demonstrando a confiabilidade e a precisão do método de espectrometria de massa em

diferentes sistemas disponíveis no mercado. Novas fronteiras vêm sendo exploradas além da identificação dos microrganismos.

2.8. Metodologias moleculares

2.8.1. Detecção dos genes codificadores de resistência através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR (Polymerase Chain Reaction) é uma técnica que consiste na amplificação de uma sequência específica de DNA, que é específica de cada microrganismo. A amplificação acontece quando utiliza-se uma enzima *Taq polimerase*, originalmente isolada da bactéria *Thermus aquaticus*, nucleotídeos para a construção da fita de DNA, iniciadores (*primers*) com sequência complementar à sequência que se quer amplificar, cloreto de magnésio (o magnésio é cofator da enzima), tampão para manter as condições da reação estáveis para o funcionamento correto da enzima e por último, o molde de DNA. Depois a reação será levada ao termociclador para ocorrer a amplificação, que ocorre em três etapas: desnaturação, anelamento e extensão.

Por ser uma técnica de amplificação de DNA, tem muitas aplicações, como a utilização do produto da PCR para sequenciamento de uma região específica do genoma, diagnóstico de doenças genéticas, identificação de *fingerprints* genéticos no caso dos testes de paternidade ou forenses, avaliação da presença de genes de resistência, entre outras.

A PCR-Multiplex é uma reação na qual são colocados dois ou mais pares de iniciadores em uma mesma reação podendo ser feita a detecção de mais de um gene no DNA a ser estudado com somente uma reação. As temperaturas de anelamento dos iniciadores devem ser próximas umas das outras para que ocorra a amplificação da região-alvo corretamente e os produtos devem ter tamanhos diferenciados para serem visualizados após a corrida eletroforética. É uma técnica muito utilizada para detecção de mais de um gene de resistência. A principal vantagem da técnica é reduzir o tempo e gastos (VanGuilder *et al.,* 2008).

2.8.2. Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

As metodologias de tipagem molecular se baseiam em diferenças na sequência ou na organização do DNA genômico para realização de discriminação entre as linhagens e tem sido as mais utilizadas, para a análise do polimorfismo genético das linhagens bacterianas, em situações de surtos envolvendo linhagens relacionadas epidemiologicamente.

A metodologia de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) é provavelmente a técnica de DNA *fingerprinting* mais utilizada para tipagem de uma variedade de bactérias, pois geram padrões de bandas de DNA. A técnica consiste no aprisionamento do DNA total

das cepas em blocos de agarose, seguido pela digestão com enzimas de restrição específicas. Devido ao fato das endonucleases de restrição possuir sequências conhecidas, o perfil de bandas pode ser analisado e as linhagens da mesma espécie podem ser relacionadas entre si. A separação dos fragmentos é realizada em eletroforese de campo pulsado, onde campos elétricos alternados são aplicados. Os padrões dos fragmentos gerados são comparados, determinando a similaridade entre as cepas.

Esta metodologia apresenta elevado poder discriminatória e alta reprodutibilidade, porém como existem variados protocolos em diferentes laboratórios, disponíveis para a realização dessa metodologia, a reprodutibilidade inter laboratorial fica um pouco prejudicada quando se compara estas imagens e determina a similaridade entre elas (Dworkin *et al.,* 2006)

2.9. Coleção de culturas

Os organismos vivos, suas células ou partes replicáveis (genomas, cDNAs (*complementary* DNA), plasmídeos, vírus) são os elementos básicos das ciências da vida e biotecnologia. Eles são amplamente utilizados como material de referência em diversos estudos científicos, setores da indústria, produção de compostos, combustíveis e alimentos. Representam importantes ferramentas para a geração de conhecimento e conservação da biodiversidade.

No início do século passado, os cientistas reconheceram a necessidade da existência de coleções de microrganismos para servir a investigação científica em todo o mundo. Desde então, CCs começaram a ser desenvolvidas no mundo todo como uma verdadeira fonte de pesquisas e atualmente a importância da preservação *ex situ* para o uso de recursos microbianos é inegável (Lima, 2008). A maneira mais eficaz de conservar microrganismos de importância clínica e econômica é a preservação em coleções. Por muitos anos, as infra-estruturas e recursos, físicos ou econômicos, eram muito limitados. Os catálogos, quando disponíveis, só existiam em versões impressas e maioria das coleções serviam apenas usuários nacionais ou mesmo locais (Simões *et al.,* 2013a). Com o tempo, a sexigências sobre CCs mudaram à medida que novas tecnologias e o emprego dos microrganismos foram sendo descobertos. Muitos países foram se tornando centros de recursos biológicos (BRC-*Biological Resource Centre*). As CCs existentes e os BRC foram ganhando maior reconhecimento sobre a importância de sua existência.

As CCs de microrganismos surgiram inicialmente como suporte básico para o avanço dos estudos em microbiologia, nas áreas de taxonomia e epidemiologia. Foram criadas como centros de conservação que tem a função de coletar microrganismos relevantes. Nas últimas décadas, com o avanço do conhecimento nas áreas de bioquímica, fisiologia celular e principalmente de genética molecular, notou-se especialização das

coleções, direcionadas aos microrganismos com potencial tecnológico e ambiental. O interesse na manutenção destes microrganismos ganhou mais força quando as coleções passaram a ser vistas também como uma base de oferta de genes, proporcionando infinitas possibilidades de aplicação em diferentes áreas do conhecimento.

As CCs estão espalhados por todo o mundo, entre os cinco continentes e têm diferentes tipos de apoio, que vão desde pequenos centros privados a grandes centros de serviços e possuem diferentes objetivos, políticas e acervos. A maioria tem apoio governamental ou da universidade, privada ou industrial. CCs podem oferecer vários serviços: armazenamento, depósito de patentes, distribuição, identificação, formação e consultoria de serviços. Para o fornecimento de serviços com padrão de qualidade elevado, técnicas e procedimentos apropriados devem estar em operação de acordo com a legislação, regulamentos e políticas nacionais e internacionais (Stackebrandt, 2010; WFCC, 2014).

O laboratório de microbiologia clínica tem a função de criar a CC de microrganismos porque os laboratórios são responsáveis pela coleta, isolamento, purificação e preservação de microrganismos que foram adequadamente caracterizados. Coleções microbiológicas *ex-situ* podem ser classificadas como coleções de trabalho, coleções institucionais ou coleções de serviço e merecem atenção especial como a infra-estrutura que é fundamental na preservação, distribuição e informações a respeito dos microrganismos. O estabelecimento de uma CC, requer previamente a utilização de técnicas de identificação de microrganismos que leve a elevados índices de confiabilidade alta, como as citadas neste trabalho, com a missão de preservar a memória epidemiológica de patógenos. A expansão do acervo geralmente é um dos focos da coleção, bem como realizar intercâmbio ativo de material com outras instituições e coleções, tanto nacionais quanto internacionais.

A identificação microbiológica decorre inicialmente, de provas bioquímicas e se possível com outras modernas metodologias, mas o uso de técnicas de biologia molecular enriquece o conhecimento e o valor das coleções, trazendo um impacto significativo na qualidade da informação, tornando esta coleção competitiva nacional e internacionalmente além de possibilitar a solução dos problemas de classificação relacionados à caracterização. As CCs vêm sendo utilizadas em todo o mundo e são elementos chave para muitos programas de pesquisa, cursos de treinamento, processos industriais e outras aplicações tecnológicas. Neste contexto, os microrganismos devem ser mantidos sem alterações para assegurar a reprodutibilidade e sustentabilidade. Os microrganismos são cultivados, mantidos viáveis, tornando-se disponíveis para usuários interessados.

2.9.1. Curador da coleção de cultura

A garantia da pureza, conservação, identificação taxonômica do microrganismo e as informações a ele associadas, que alimenta o banco de dados e auxilia futuras pesquisas e enriquecimento do acervo, são funções do curador. Diversas atividades e responsabilidades estão associadas as CCs dos microrganismos e ao curador, que não somente a manutenção de determinado material em local adequado.

O curador deve orientar a equipe de funcionários que vão manipular as coleções para que possam seguir os procedimentos apropriados para o nível de risco biológico dos microrganismos a ser manipulado, como definido pela Organização Mundial de Saúde e como interpretado pela legislação, regulamentos e políticas nacionais. Este procedimento visa evitar a contaminação de amostras, o risco de infecção e a dispersão no meio ambiente (SBM, 2006). As CCs devem ser gerenciadas por um profissional qualificado (curador) com experiência e conhecimento sobre os microrganismos, Certamente o sucesso da preservação é fundamental e exige estrutura física e familiaridade com técnicas modernas, que deverão causar o mínimo dano as células, assegurar a máxima viabilidade, estabilidade genética. seus requerimentos de crescimento, preservação e suas propriedades. O curador deve também conhecer os procedimentos operacionais, as técnicas e os serviços oferecidos pela coleção.

O curador deve estar consciente das suas obrigações e a instituição que abriga uma coleção deve estar ciente e aceitar as responsabilidades inerentes à manutenção de um serviço público com padrões apropriados. Em um ambiente científico constantemente em transformação, muitas coleções ficam sob ameaça de extinção por causa do financiamento insuficiente, com mudança de estratégias de apoio do governo para o custo com novas tecnologias. O compromisso com a manutenção da coleção e de seus serviços deve ser incluído no planejamento ou nos objetivos estratégicos da instituição.

2.9.2. Preservação de microrganismos

A preservação e manutenção das CCs devem ser feitas de forma a garantir aos microrganismos sua sobrevivência, estabilidade e pureza durante períodos prolongados de tempo. Os microrganismos requerem freqüentemente métodos específicos de preservação a fim de que sejam assegurados viabilidade (propriedades morfológicas/fisiológicas), armazenamento, pureza e estabilidade genética (SBM, 2006). Saber como preservar culturas bacterianas e dispor de técnicas simples e eficientes é um desafio no laboratório de microbiologia. A importância de se preservar culturas bacterianas vem da necessidade de se poder dispor do microrganismo a qualquer momento, quer para fins experimentais, quer para trabalhos de rotina ou para atendimento a solicitações de outros pesquisadores, para fins didáticos, para estudos comparativos, entre outros.

É necessário que se preserve o organismo vivo, por período de tempo o mais longo possível, através de um método que não permita ou minimize a ocorrência de mutações ou de variabilidade que possam vir a refletir na patogenicidade, virulência ou características básicas da cultura original. A taxa de mutações espontâneas entre bactérias é sempre elevada, o uso de qualquer método que permita a multiplicação dos microrganismos, envolve o risco de que ocorram mutações e aumento da probabilidade de alterações na sua estabilidade genética.

Considerando as exigências dos microrganismos, a manutenção pode ser feita a temperaturas relativamente baixas em curtos períodos (dias ou meses). Contudo, para a conservação prolongada apresenta-se como opção mais viável o armazenamento em temperaturas ultra baixas como a criopreservação em freezers a -80℃, em nitrogênio líquido ou o processo de liofilização que consiste no congelamento e desidratação dos microrganismos em atmosfera de vácuo (Costa *et al.,* 2009).

2.9.2.1. Preservação a médio prazo

2.9.2.1.1. Congelamento comum

O congelamento comum consiste na conservação de agentes em temperaturas relativamente baixas entre 4 e -20℃. Apresenta-se como um dos métodos de manutenção mais simples e baratos, além de oferecer boa segurança para o armazenamento de diversos microrganismos por períodos de 3 meses a 2 anos. Trata-se de um método simples, não requer equipamentos sofisticados, nem mesmo quanto ao preparo do material. Como desvantagem, verifica-se possível redução da viabilidade de alguns microrganismos em função dos danos causados às células decorrentes da formação de cristais de gelo e da variação eletrolítica na faixa de temperatura utilizada (Costa *et al.,* 2009).

2.9.2.2. Preservação a longo prazo

2.9.2.2.1. Criopreservação

A criopreservação consiste na manutenção de uma variedade de microrganismos a baixas temperaturas (-20℃ a -80℃ em freezers) e ultra baixas temperaturas (-150℃ a -196 ℃ em containers de nitrogênio líquido). A manutenção em baixas temperaturas, apesar de eficiente, pode comprometer a qualidade das amostras armazenadas, visto a possibilidade de variações de temperatura em freezers. Já os sistemas de nitrogênio líquido garantem o armazenamento a temperaturas constantes e por longos períodos.

O processo de congelamento envolve complexos fenômenos que, depois de décadas de pesquisas, não foram totalmente compreendidos. Sendo a água o componente vital das células e fundamental para os processos bioquímicos, o metabolismo celular cessa quando a água de todo sistema é convertida em gelo (Simione, 1998).

2.9.2.2.1.1. Danos decorrentes do processo

Alguns cuidados são necessários para que a criopreservação seja realmente eficiente. Muitos fatores podem afetar a viabilidade e estabilidade celular, principalmente os danos celulares que estão relacionados a água sob condições de baixas temperaturas. A água congelada expande-se ao cristalizar e no processo de fusão tende a recristalizar e aglutinar, formando longos e protuberantes cristais de gelo capazes de produzir uma série de danos mecânicos, bioquímicos e osmóticos (Simione, 1998).

Durante o congelamento, as células são suscetíveis a desidratação e instabilidade osmótica devido à alteração das concentrações de sais das células. Em condições normais, a solução extracelular apresenta maior volume que a intracelular, e por isso, o congelamento extracelular tende a ocorrer primeiro. Os solutos contidos no meio externo se concentram numa pequena fração de água sob estado líquido, que passa a exibir uma maior pressão osmótica e promover o fluxo de água para fora da célula. Altas concentrações intracelulares inibem a formação de gelo, entretanto devido a desidratação e a elevada concentração de íons podem ocorrer severos danos às células (Wolfe e Bryant, 2001).

Segundo Simione e colaboradores, um rápido congelamento diminui os efeitos danosos das diferentes formações dos cristais de gelo, mas leva ao aumento da quantidade de gelo intracelular. Já o congelamento mais lento, resulta em grande perda de água pelas células e menos gelo interno, mas aumenta os efeitos do desequilíbrio osmótico. Quando os cristais de gelo se formam, eles se expandem e podem destruir a parede das células. Acelerando o processo de congelamento sendo ideal o decréscimo de 1°C por minuto, alguns destes eventos destrutivos podem ser evitados. Cristais de gelo vão se formando dentro das células de maneira que ela vai perdendo água e o tamanho dos cristais tendem a diminuir, reduzindo a destruição das paredes celulares. O uso de aditivos ou químicos crioprotetores, que servem para proteger as células durante o congelamento, pode diminuir os danos provocados pela concentração do soluto e pela formação dos cristais de gelo (Simione, 1998).

Segundo Dumond e colaboradores, a morte celular pode ser prevenida em dois casos: o primeiro caso corresponde a uma taxa de resfriamento lento, durante o qual a água intracelular pode fluir para fora da célula e o segundo caso corresponde a velocidade de resfriamento muito rápido, o que envolve o congelamento total da água intracelular antes qualquer transporte de água ocorra. A compreensão dos resultados de um trabalho realizado por Dumond baseia-se na hipótese de que, se o fluxo de água é mais rápido do que o fluxo térmico, então não irá ocorrer a cristalização intracelular e a taxa de sobrevivência celular será alta. Em contraste, logo que o fluxo térmico é igual ao fluxo de água, em seguida, a taxa de congelamento irá induzir a cristalização da água intracelular

durante a saída de água, um processo osmótico que parece provocar a morte celular (Dumont *et al.,* 2004).

A combinação entre os mecanismos de efluxo de água e a constituição de cristais de gelo é responsável por danos irreversíveis à membrana e, por conseguinte, pela morte celular. A extensão dos danos causados pelo gelo intracelular depende do grau de formação de gelo e do tamanho dos cristais. Desta forma, algumas alternativas são muito utilizadas para minimizar estas ocorrências, como a utilização de agentes crioprotetores com vistas a prevenir a cristalização mediante a redução da atividade de água, adoção de uma taxa de congelamento uniforme (aproximadamente 1°C por minuto) e a prática de um processo de descongelamento rápido (banho-maria a 37°C) (Costa *et al.,* 2009).

Os microrganismos demonstram maior resistência ao congelamento se não forem obtidos de culturas recentes, devendo ser congelados preferencialmente no final da fase log ou início da fase estacionária de acordo com a curva de crescimento. Em relação ao tempo para ser congelado depois de exposto aos agentes de proteção, também é um fator importante. A exposição prolongada pode prejudicar/danificar as células assim como a concentração do criopreservante que pode ser tóxico. O período de tempo entre a mistura do crioprotetor com a suspensão bacteriana e o início do processo de congelamento é chamado de período de equilibração. Para a maioria das células, o período de equilibração é em torno de 15 minutos, não devendo ultrapassar 45-60 minutos (Simione, 1998).

2.9.2.2.1.2. Agentes conservantes para criopreservação

Os agentes crioprotetores assumem diversas funções no processo de congelamento. Estes agentes são mais efetivos quando podem penetrar a célula, atrasando o congelamento intracelular e diminuindo danosos efeitos osmóticos. Estes compostos são capazes de realizar ligações com as moléculas de água, reduzindo a formação e o tamanho dos cristais de gelo, bem como as concentrações de soluto tanto no meio extracelular quanto no intracelular. Os agentes crioprotetores mais comumente usados são o dimetilsulfóxido (DSMO) e o glicerol. Para a maioria dos laboratórios de microbiologia clínica o glicerol é o agente de escolha, é bioquimicamente compatível com as estruturas celulares e geralmente é menos tóxico que o DSMO. A concentração ótima do agente de crioproteção varia de acordo com o tipo celular, para bactérias e leveduras recomenda-se geralmente o uso do glicerol 10% (v/v). O congelamento em frascos tipo *eppendorfs*, são muito utilizados e evitam riscos de extravasamento e contaminação das amostras, nas caixas de suporte durante o período de congelamento. O descongelamento deve ser rápido, evitando a exposição excessiva agente crioprotetor (Simione, 1998).

2.9.2.2.2. Liofilização

A liofilização é considerada uma das técnicas mais eficientes para a manutenção de microrganismos por garantir viabilidade por longos períodos e ser aplicável para a maioria deles (Simões *et al.,* 2013a). Uma grande variedade de CCs depende deste processo para garantir e preservar a diversidade de seus espécimes, por isso, tem sido utilizada como método de referência para a preservação a longo prazo (Costa *et al.,* 2009).

A liofilização se baseia na remoção da água intracelular dos microrganismos congelados, por sublimação, evitando a formação de cristais de gelo, por serem capazes de provocar danos às estruturas celulares (Morgan *et al.,* 2006). Basicamente, a liofilização pode ser definida como um processo de desidratação sob condições de vácuo, envolvendo basicamente etapas de congelamento e desidratação primária e secundária. O congelamento considerada uma das etapas mais crítica, promove a inércia do material a ser liofilizado, gerando uma interrupção das reações químicas e atividades biológicas. Após esta etapa, o espécime ou material é desidratado por sublimação, seguindo-se o emprego de temperaturas de secagem, sob pressões reduzidas. Os produtos liofilizados devem ser guardados em locais com baixa umidade, baixas temperaturas abrigam de oxigênio, luz e contaminantes (Morgan *et al.,* 2006; Costa *et al.,* 2009).

Avaliando-se a taxa de sobrevivência sob as mesmas condições, imediatamente após a execução da liofilização, as bactérias GP apresentaram maior índice quando comparado com as GN. A maior resistência a desidratação pelas GP, provavelmente seja pela estrutura da sua parede. Quanto à avaliação durante o período de estocagem, observa-se que a taxa de sobrevivência de algumas espécies se mantém fixa com o passar do tempo, enquanto algumas espécies apresentam um declínio durante os primeiros cinco anos, tendendo a estabilizar por volta dos 15 anos (Miyamoto-Shinohara *et al.,* 2008). Considerando a ampla utilização desta técnica, verifica-se que o método oferece alta estabilidade do material a ser conservada, baixa taxa de mutação e contaminação. Além disto, tem a vantagem de não requerer constantante monitoramento e ocupar pouco espaço no armazenamento. Quanto ao transporte de culturas de referência ou até mesmo materiais de rotina, o liofilizado pode ser transportado a longas distâncias em temperatura ambiente, não havendo necessidade de refrigeração. Como desvantagem verifica-se a necessidade de equipamentos caros para a desidratação do material, além dos custos com o preparo das culturas (Miyamoto-Shinohara *et al.,* 2008).

2.9.3. Considerações finais da preservação das coleções de cultura

Por medidas de segurança e para minimizar a possibilidade de perda de linhagens, cada cultura deve ser mantida por pelo menos dois métodos distintos. É recomendável que pelo menos um dos métodos utilizados seja a criopreservação (ultracongelamento) ou a

liofilização, pois para muitas linhagens esses métodos apresentam menos riscos de alterações genéticas, além de garantir a preservação por longo período de tempo (SBM, 2006).

A remoção da água presente em amostras biológicas viáveis em estado de congelamento ou o denominado processo de liofilização apresenta-se como alternativa capaz de retardar o relógio biológico estabelecido pela natureza. Desta forma, a liofilização e a criopreservação são as técnicas mais empregadas na conservação da biodiversidade microbiana, sendo uma das chaves para a realização dos serviços de CCs microbiológicas (Morgan *et al.,* 2006). Na maioria das vezes, os métodos de preservação mais adequados e recomendados (criopreservação e liofilização), exigem equipamentos sofisticados e recursos humanos treinados e habilitados, tanto para operar o equipamento quanto para desempenhar o protocolo operacional estabelecido (Santos *et al.,* 2008; Costa *et al., 2009*; Santos e Lima, 2010b; Simões *et al.,* 2013a).

Alguns autores relataram que apesar da existência de diversas técnicas de manutenção de microrganismos, o princípio do congelamento-descongelamento se manteve entre os mais importantes e viáveis para a preservação celular (Dumont *et al.,* 2004; Costa *et al.,* 2009).

2.9.4. Informação dos dados referente as coleções de cultura

É necessário conhecer e disseminar os dados das culturas que são tão valiosos quanto o próprio microrganismo. Um sistema de informações cumulativas evoluiu desde a origem das CCs. A informação sobre o que já foi colecionado ao longo do tempo, são imprescindíveis para áreas prioritárias como pesquisa e conservação de grupos taxonômicos pouco estudados, dentre outras funções (Canhos, 2003). Porém, esse é um árduo caminho que inclui entre os seus desafios: o gerenciamento da digitação e digitalização de dados e imagens juntamente com a organização e modernização da coleção, seu armazenamento em ambientes adequados e identificação acurada. Este último, com certeza, o maior dos desafios, pois a espinha dorsal do conhecimento em biodiversidade é a pesquisa sistemática nas coleções científicas.

A caracterização dos acessos, feita frequentemente em parceria com diferentes grupos em projetos de pesquisa, também vem assumindo espaço na rotina dos curadores. Informações básicas sobre as características das linhagens preservadas (crescimento, caracterizações genéticas, atividade biológica, produção de enzimas e toxinas), auxiliam na seleção inicial e divisão em grupos de acordo com que se necessita. Além disto, as CCs oficiais devem estar preparadas para o recebimento de amostras de outras coleções e para o envio de dados quando solicitado (SBM, 2006).

Atualmente existem algumas iniciativas que buscam integrar dados de coleções brasileiras, porém inúmeros desafios são encontrados. Ainda existem problemas estruturais que devem ser tratados de forma clara e objetiva, a fim de buscar soluções, para maximizar o uso dos acervos das coleções brasileiras. É recomendável que a coleção possua um *back-up* do acervo principal em local distinto e separado, evitando os riscos de perda de importantes recursos genéticos por diferentes motivos (SBM, 2006).

Os bancos de dados avançados na web juntamente com as informações de seqüências de nucleotídeos e de proteínas depositadas no GenBank, são fundamentais para facilitar o acesso e transferência de conhecimentos, os mais iimportantes são: MycoBank (www.mycobank.org), *Common Access to Biological Resources and Information*-CABRI (www.cabri.org), StrainInfo (www.straininfo.net), GBIF (www.gbif.org), Índice *Fungorum* (www.indexfungorum.org) (Simões *et al.,*2013a).

2.9.5. Coleções biológicas brasileiras

As coleções biológicas científicas brasileiras se iniciaram no século XIX e desde aquela época é comum a permuta e doação de material científico entre coleções nacionais e de outros países. As permutas, porém, eram restritas ao círculo de influência dos curadores e ao interesse de cada instituição, independente do acervo que dispunham. Com o advento da informática e com a padronização das informações mínimas necessárias para uma coleção científica, diversas iniciativas mundiais têm crescido e disponibilizado grande quantidade de dados sobre os microrganismos existentes no mundo (Fiocruz, 2014; WFCC, 2014).

No Brasil, na maioria dos casos, as coleções decorrem da iniciativa dos pesquisadores. O Brasil dispõe de várias coleções de referência, que vem se desenvolvendo continuamente como a vasta biodiversidade dos diferentes ecossistemas nele contido. Entre tantas podemos destacar as citadas abaixo.

As Coleções Biológicas da Fiocruz (CBF) inserem-se nas áreas da microbiologia, zoologia e hispotatologia. Atualmente 21 CBF são reconhecidas institucionalmente. Estas coleções preservam, identificam e organizam o material biológico disponibilizando este acervo para outras instituições, em conformidade com as normas e legislações nacionais e internacionais. Adicionalmente, disponibiliza os guias da *World Federation of Culture Collection* (WFCC) e da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) Neste sentido vem cumprindo um papel importante para a preservações de patrimônio biológico, disponibilização para aplicação deste material em pesquisa, desenvolvimento e inovação que incluem, entre outros, a produção de insumos para diagnóstico, vacinas e medicamentos, guarda de material estratégico para a ciência e segurança nacional, uso sustentável da biodiversidade, além de cumprirem a função de

coleções “Fiel Depositárias” para o depósito obrigatório de sub-amostras para pesquisas científicas, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico (Fiocruz, 2014).

Na Fiocruz, estas coleções comecaram a ser composta no início do século 20 quando durante as expedições científicas, pesquisadores coletaram, analisaram e depositaram material biológico de diversas partes do Brasil. Atualmente a Fiocruz tem 30 CCs biológicas reconhecidas institucionalmente que são constituídas por acervos de diversos tamanhos que vão além de centenas de microrganismos (Fiocruz, 2014).

O movimento de organização e reconhecimento das CBF teve inicio em 2006, com a criação do Forum Permanente de CBF, que foi posteriormente transformado na Camara Técnica de CBF. Um dos resultados deste movimento e o Documento institucional para o desenvolvimento destas coleções, com reconhecimento institucional, formalizado por meio do manual de organização das CBF. Os procedimentos foram padronizados, com foco na gestão da qualidade e dos dados da CBF. Com isto a meta foi garantir que os serviços ofertados pelas CBF, a rede de vigilância epidemiológica, acadêmica e indústria sejam de excelente qualidade (Fiocruz, 2014).

A CC de Bactérias de Origem Hospitalar (CCBH), filiada à WFCC situa-se no LAPIH, são originárias de surtos hospitalares de várias regiões do Brasil e representam um acervo de grande importância para a sociedade em geral. Nessa coleção estão preservadas cerca de 5.000 cepas de bactérias de diferentes gêneros. A coleção realiza diversos serviços tais como: a manutenção, preservação, depósito e fornecimento de culturas, caracterização taxonômica e análise genotípica (Fiocruz, 2014).

Com base nas experiências com suas coleções microbiológicas, a Fiocruz tem se dedicado a criação do Centro de Recursos Biológicos em Saude (CRB-Saúde), que visa integrar as diversas coleções microbiológicas e será um centro de pesquisas, constituído por microrganismos patogênicos, relacionados principalmente a doencas tropicais ou com potencial biotecnológico na área de saúde, servindo ao país, fornecendo e recebendo linhagens, investigando novas metodologias de preservação e identificação. O CBR-Saúde oferecerá produtos e serviços certificados de forma a propiciar sustentabilidade para inovações biotecnológicas em saúde, bem como a preservação da diversidade microbiana do Brasil (Fiocruz, 2014).

Uma grande referência brasileira com reconhecimento internacional, em tecnologia e pesquisa, a EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), realiza pesquisas em diferentes temas, produtos e ecossistemas, aliando agricultura, pecuária, agroindústria e meio ambiente, desenvolvendo novas tecnologias de produção e mantém CCs diversas. As CCs de microrganismos na Embrapa receberam maior atenção nos últimos anos, devido principalmente ao aumento da importância dos microrganismos para a agricultura e o meio ambiente, seja na forma de produtos para uso direto pelo agricultor, ou nos processos da

agroindústria e de biotecnologia. A rede de recursos genéticos microbianos da Embrapa está atualmente organizada em diferentes agrupamentos de microrganismos de acordo com as funções que eles exercem. Cada agrupamento contem em geral, mais de uma coleção institucional de pesquisa e diversas coleções de trabalho associadas (Embrapa, 2014).

2.9.6. Colaboração nacional e internacional

As colaborações relevantes (nacionais e internacionais) fornecem visibilidade para as coleções, pois podem facilitar a comunicação e a troca de informações (dados). Muitos países possuem associações ou federações de coleções, que fornecem excelentes oportunidades para a troca de informações e discussões de problemas em comum. A Federação Mundial de Coleções de Culturas (WFCC) possui comitês relacionados com as áreas de educação, patentes, regulamentos de postagem, quarentena e segurança, biodiversidade e publicidade. Estas informações podem ser úteis no estabelecimento de novas coleções.

As políticas comuns são necessárias para lidar com as exigências regulamentares das coleções, para controlar o acesso aos microrganismos patogênicos perigosos e em particular para cumprir a Convenção sobre Diversidade Biológica. Os países que têm a maior parte da biodiversidade necessitam de apoio. A Federação Mundial para a Cultura Coleções (WFCC) tem um papel fundamental a desempenhar.

A *Word Federation for Culture Collection* (WFCC) é uma comissão internacional multidisciplinar de na área de ciências biológicas, criada com objetivo promover e apoiar o estabelecimento de CCs em seus serviços prestados, criando uma rede de informação entre as coleções e seus usuários, publicações, organizando seminários e conferências, para garantir a perpetuação de importantes coleções. Seu foco é a autenticação, manutenção e distribuição das culturas de microrganismos e células cultivadas (WFCC, 2014).

Na década de 1960, através das pesquisas do Dr. Skerman e colaboradores, realizadas na universidade de Queensland, na Austrália, foi desenvolvido uma base de dados internacional sobre as CCs em todo o mundo. Consequentemente, foi criado o *World Data Center for Microorganism* (WDCM), que é mantido no Japão pelo *National Institute of Genetics* (NIG). O banco de dados WDCM constitui uma importante fonte de informação para toda a atividade microbiológica e também atua como um foco para as atividades de dados entre os membros WFCC. É recomendável que as coleções possuam registro no Centro de Dados Mundial de Microrganismos (WDCM) da WFCC (WDCM, 2014).

Atualmente, segundo dados da WDCM, existem 673 CCs provenientes de 70 países, que estão registradas no WFCC, totalizando 2.433.915 microrganismos, sendo que 1.041.138 são bactérias. Muitas pessoas estão envolvidas neste trabalho (5.647) e 48

coleções produzem catálogos mostrando e oferecendo seus serviços como armazenamento, distribuição, identificação, treinamento e consultoria. Estão envolvidas 264 instituições governamentais, 264 de universidades, 59 semi-governamental, 43 da rede privada e 24 da indústria (WDCM, 2014).

O Brasil tem atualmente 71 CCs registradas na WFCC, e segundo o WDCM é o país com maior número de coleções da Américas, seguido dos EUA (26), Canadá (18), México (18) e Argentina (13). Apresenta também posição de destaque no mundo, liderando em serviços prestados, com o maior número de participações, em distribuição, identificação, formação e consultas. Na Europa, a França lidera com 38 CCs, seguido da Rússia (22), Reino Unido (19), Alemanha e República Theca (13 cada), Grécia, Holanda e Portugal (6 cada) (WDCM, 2014).

A Europa tem uma grande variedade de Centros de Recursos atuando como fornecimentos e serviços das organizações para a comunidade científica. Um deles e o portal da CABRI, o acesso comum aos recursos biológicos e serviços de informação, oferecem vantagens para os seus usuários, que em vez de ter que examinar um grande número de banco de dados, catálogos e outras fontes de informação. CABRI oferece acesso mundial a esses bancos de dados e permite que se verifique simultaneamente sobre a disponibilidade de um determinado tipo de microrganismo ou de recursos genéticos (CABRI, 2014).

O *European Culture Collections Organisation* (ECCO) na Europa foi criada em 1981, com o objetivo de colaboração, com troca de idéias e informações, sobre todas as atividades de uma CC. O ECCO tem 61 membros de 22 países europeus e tem mais de 350.000 amostras, representadas por leveduras, fungos filamentosos, bactérias, fagos, plasmídeos, algas, protozoários, entre outros. Representa uma fonte vital de cepas de referência para investigadores e a indústria, com uma enorme biodiversidade de microrganismos isolados de seres humanos, animais, plantas, alimentos e meio ambiente. A missão da ECCO é apoiar os interesses das coleções européias, assim como apoiar os curadores na melhoria dos padrões técnicos e científicos relacionados às atividades das CCs, com a colaboração com a WFCC (ECCO, 2014).

A diversidade destas coleções no Brasil, agregado ao grande valor científico, despertou o interesse na criação de uma coleção de bactérias de referência no Estado do Espirito Santo. Visando a interação entre instituições, além de abrir competências na área de CC. O HUCAM, apresentou seu interesse na criação da “CCBR-HUCAM” na ECCO. A criação e ampliação tornou o principal objetivo deste trabalho com linhagens bacterianas identificadas pelas tecnologias mais modernas no mercado e agregando valores a sua caracterização genética (Klein *et al.,* 2011). Atualmente está em andamento na UFES o processo para o registro da CCBR-HUCAM na WFCC.

2.9.7. Coleções de microrganismos (*ex situ*) internacionais

Existem vários centros de CCs podendo citar os núcleos de coleções com relevância mundial como a ATCC (*American Type Culture Collection*), de Manyland, nos EUA; o IMI (*International Mycological Institute*), com sede na Inglaterra; o CBS (*Centraalbureau voor Schimmelcultures*), em Baar-Delft, Holanda; o IFO (Institute For Fermentation), em Osaka, Japão; o JCM (*Japan Collection of Microorganisms*), em Wako, Japão e a MUCL (*Mycotheque De L.Universite Catholique de Luvaim*), localizada em Luvain-le-Neuve, Bélgica.

A Micoteca da Universidade do Minho é uma referência em Portugal, atuando como um centro de conhecimento, informação e formação, de acordo com padrões internacionais de qualidade possuindo uma das mais relevantes CC de fungos filamentosos da Europa. Foi estabelecida em maio de 1996 pela Universidade do Minho (www.micoteca.deb.uminho.pt). A MUM teve seu registro na WFFC em 2001, com o número 816 na WDCM. Em 2002, filiou-se a ECCO. Todas as contribuições que MUM tem oferecido ao país e a outros paises, além das novas identificações de espécies fúngicas, faz com que a lacuna seja preenchida entre a ciência e a sociedade (Paterson *et al.,* 2012).

2.9.8. Controle de qualidade das coleções de cultura

Em relação à gestão da qualidade, as coleções aplicam a ISO 9001, que é uma norma gerencial focada na gestão (ISO, 2014). Além disso, CCs tem o papel crucial de fornecer microrganismos autênticos e reprodutíveis, para a comunidade científica e seus usuários. Devem adotar boas práticas garantindo padrões operacionais de alta qualidade e colaborações entre os diferentes Centros de Recursos Biológicos (BRCs), que é um requisito atual, sendo um processo dinâmico em constante evolução, até mesmo devido o aumento crescente e acumulação de dados sobre os recursos biológicos que aumentam a cada pesquisa feita (Simões *et al,* 2013a). Portanto as CCs devem-se basear nas recomendações de *guidelines* como o "*Best Practice Guidelines for Biological Resource Centres"* (BRCs), criado pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD- *Organisation for Economic Co-Operation and Development*), catálogo eletrônico CABRI disponibilizado um conjunto de diretrizes para ajudar coleções de pôr em prática as melhores práticas e "*World Federation for Culture Collections Guidelines"* da WFCC (OCDE, 2007; CABRI, 2012; WFCC, 2014).

2.9.9. Considerações finais das coleções de cultura

O recurso genético bacteriano bem conservado e caracterizado representa importante fonte de variabilidade genética e proporciona estoques de material para uso em diversos programas da sociedade, como insumos baseados em microrganismos, material

certificado, informações associadas e outros serviços. Isto cria oportunidades para desenvolvimento de processos tecnológicos, de comercialização de serviços e de agregação de valores a biodiversidade brasileira.

Assim sendo, as coleções de microrganismos precisam de processos harmonizados e estruturados de acordo com as exigências nacionais e internacionais, incluindo os aspectos da legislação, que englobam as atividades de coleta e acesso ao patrimônio genético. A organização e a estruturação das coleções microbianas sem um padrão de gestão pode levar a perda de muitos microrganismos, tornando-os inviáveis para a utilização. Além disso, o atendimento às normas de qualidade nacionais e internacionais é fundamental para que a CCs possam realizar intercâmbio com instituições públicas e privadas.

Com base nos dados apresentados por Klein e colaboradores, a CCBR-HUCAM foi inicialmente criada em 2011, sendo palco para a primeira pesquisa relizada por este estudo, com uma diversidade de microrganismos isolados de ICS (Klein *et al.,* 2012). Com a incorporação de novas metodologias à taxonomia e tecnologias para estudos moleculares, a CCBR-HUCAM passou também a representar importante banco genético. Já vem sendo reconhecida como patrimônio institucional da UFES, necessário do ponto de vista legal, facilitando o apoio as atividades curatoriais, além de garantir a integridade e segurança do acervo bacteriano, que servem a coletividade de pesquisadores e gestores, garantido a disseminação do conhecimento científico.

A formação da CC da UFES (CCBR-HUCAM) demonstra a busca da qualificação científica das pesquisas através da construção e institucionalização de seu patrimônio científico, como meio eficaz para garantir uma real autonomia que viabilize a realização, consolidação e expansão das pesquisas na instituição. As CCs são importantes reservatórios de microrganismos, proporcionando uma fonte vital de informação, podendo servir como prestadores de serviços seguros e confidenciais de microrganismos chave para a investigação científica e na indústria, além de ser uma poderosa fonte de microrganismos citados em trabalhos científicos, tanto para serem utilizados na confirmação dos resultados como para um estudo mais aprofundado. São fonte dinâmica e permanente de conhecimento sobre a biodiversidade. São registros da variação morfológica e genética passada e recente, da distribuição geográfica, bem como de outras valiosas informações. O mundo deve se beneficiar de sua diversidade microbiana, o que é crucial para a resolução de problemas crescentes na saúde pública, fornecimento de alimentos e combate a pobreza.

Capítulo 3. Materiais e Métodos

3.1. Linhagens bacterianas

O isolamento das linhagens para estudo experimental desenvolvido nesta tese foi aprovado pelo comitê de ética do Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes (HUCAM). As linhagens bacterianas utilizadas nesta tese foram provenientes de hemoculturas previamente coletadas no período de janeiro a dezembro de 2011, no HUCAM, num total de 282 linhagens, obtidas de pacientes atendidos nos seguintes setores hospitalares: Cardiologia, Clínica Cirúrgica, Enfermarias de Clínica Médica, Centro de Terapia Intensiva, Gastrologia, Ginecologia, Hematologia, Nefrologia, Unidade de Tratamento Intensivo Neonatal, Pronto Socorro, Pediatria, Pneumologia e Urologia. Os setores hospitalares foram agrupados desta forma tomando-se como critério o tipo de atendimento prestado.

3.1.1. Seleção das Linhagens

Baseado em altas taxas de mortalidade em ICS e na emergência de uma variedade de mecanismos de resistência tais como a produção de ESBL, a produção de carbapenemases, as alterações nas PBPs e as alterações na permeabilidade da membrana, foram selecionadas 282 linhagens bacterianas para este estudo, um total de 107 isolados de Bacilos Gram-Negativos (33 linhagens de *Klebsiella pneumoniae,* 33 linhagens de *Escherichia coli*, 22 linhagens de *Acinetobacter baumannii,* 19 linhagens de *Pseudomonas aeruginosa*) e um total de 175 linhagens de cocos Gram-Positivos (88 linhagens de *Staphylococcus aureus*, 56 linhagens de *Staphylococcus epidermidis*, 31 linhagens de *Enterococcus* spp.).

3.1.2. Estocagem das amostras

Todas as linhagens bacterianas foram semeadas em Caldo BHI (*Brain Heart Infusion*- Oxoid-*England*) com 20% glicerol (v/v) em microtubos de 2mL e mantidas a -20^{o}C até a realização dos estudos experimentais.

3.2. Isolamento, identificação e teste de susceptibilidade aos antimicrobianos (TSA) das linhagens bacterianas.

3.2.1. Assepsia da pele e coleta do sangue

A coleta do sangue foi realizada pela equipe técnica do Laboratório de Patologia Clínica do HUCAM, exceto na Unidade de Tratamento Intensivo Neonatal (UTIN), sendo realizada pela equipe de enfermagem, seguindo os protocolos de assepsia da pele, friccionando a área de coleta da punção, com álcool a 70% em movimento centrífugo,

seguido de tintura de iodo povidona contendo 1% de Iodo ativo (PVP-I 10%) ou clorexidina alcoólica a 0.5%.

3.2.2. Volume do sangue e número de amostras

Dospacientes adultos foram coletadas 2 amostras que corresponde a 2 punções. A primeira amostra foi colocada em um frasco aeróbio, sem resinas inibidoras de antibióticos, e em um frasco anaeróbio, com resinas inibidoras de antibióticos. A segunda amostra foi colocada em um frasco aeróbio com resinas inibidoras de antibióticos, totalizando 3 frascos. O volume total de sangue foi de 30 mL (10 mL em cada frasco). Dos pacientes pediátricos, foram coletadas 1 ou 2 amostras, de acordo com o pedido médico, em meio de cultura pediátrico aeróbio com resinas inibidoras de antibióticos, com volume total de 5 mL de sangue em cada amostra. Nos pacientes da Unidade de Tratamento Intensivo Neonatal (UTIN) foi coletada 1 amostra, com volume máximo de 2 mL. As amostras foram coletadas em sítios anatômicos distintos (braço direito e esquerdo), exceto por falta de condições fisiológicas do paciente.

3.2.3. Incubação das hemoculturas

As culturas foram registradas através de código de barras e incubadas por 7 dias ou conforme solicitação médica, no sistema automatizado para hemocultura Bactec 9240 **(**Becton Dickinson), que consiste em uma incubadora, agitador e instrumento de detecção.

3.2.4. Positividade das hemoculturas

As hemoculturas positivas foram retiradas do sistema após o alarme sonoro e visual gerado, indicativodo crescimento bacteriano. Após assepsia da tampa do frasco de hemocultura com álcool a 70ºC, foi retirado uma alíquota do sangue com seringa e agulha estéril para repique em meios de cultura e preparo das lâminas para coloração de Gram.

3.2.5. Coloração de Gram

A coloração pelo método de Gram das lâminas foi realizada no mesmo dia da positividade do frasco, seguindo a técnica conforme descrito por Koneman *et al.,* 2008 e a caracterização morfo-tintorial após coloração, foi repassado imediatamente ao setor onde o paciente estava internado.

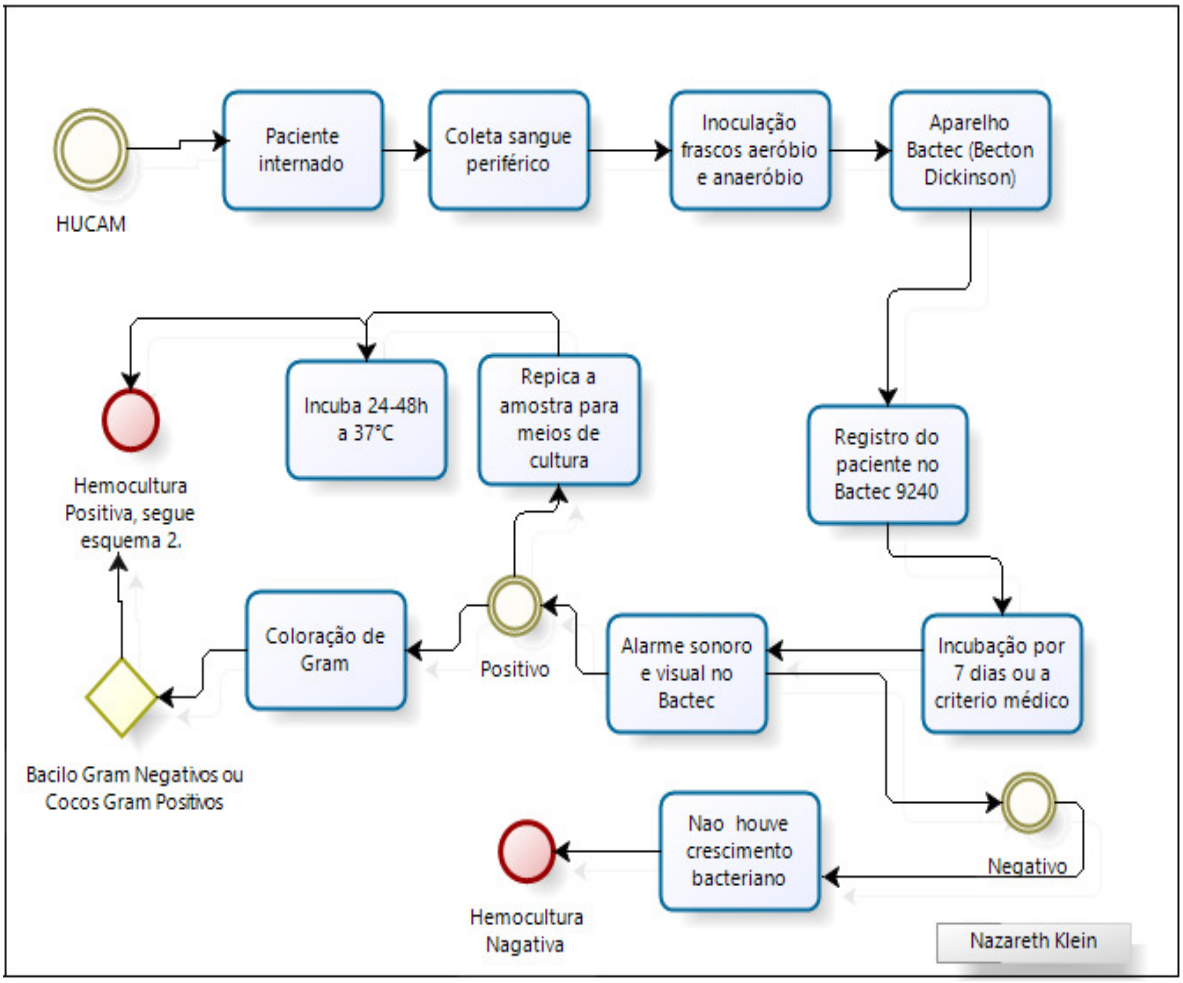
3.2.6. Meios de cultura utilizados

As hemoculturas positivas foram repicadas para os meios de cultura como o Ágar Sangue (ágar Columbia da Oxoid ou Merck, com 5% sangue de carneiro), Ágar Chocolate

(Oxoid ou Merck) colocado em jarra de CO_2, Ágar CLED (*Agar Cystein Lactose Eletrolite Deficient*- Merck).

3.2.7. Incubação dos inóculos

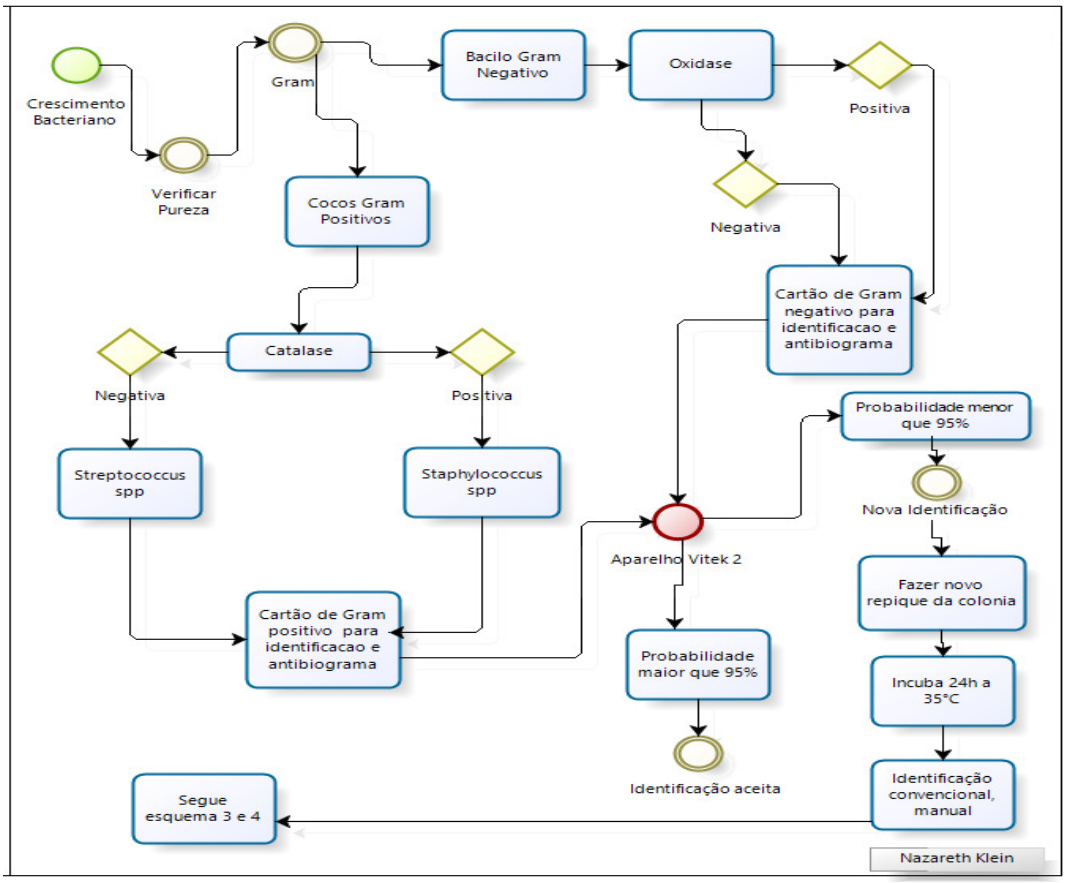
Os inóculos foram incubadas em estufa bacteriológica a 35-37ºC, para promover o crescimento bacteriano por 18-24h. No caso de crescimento negativo, os inóculos foram reincubados por mais 24h. Nos casos em que as culturas permaneceram negativas, novos repiques foram realizados após 48h do repique inicial. Os inóculos com crescimento negativo, ficaram 7 dias incubados em estufa bacteriológica a 35-37ºC, até a liberação definitiva do laudo. O esquema 1 representa o fluxo de trabalho que foi realizado, descrito nos itens acima.



Esquema 1 - Representação esquemática do fluxo de trabalho em hemocultura.

3.2.8. Identificação automatizada

A identificação inicial foi realizada pelo sistema automatizado VITEK®2 *Systems* (*bioMérieux, Marcy l'Etoile, France*). Após o crescimento bacteriano, foi verificada a pureza do crescimento. As colônias isoladas foram selecionadas para a coloração de Gram, conforme descrito por Koneman *et al.,* 2008 e também para a escolha do painel de Gram-Positivo GP 342, contendo 43 testes bioquímicos ou de Gram-Negativo GN 341 contendo 47 testes que são de utilização única (figura 1). Os cartões são baseados em métodos bioquímicos estabelecidos e em substratos, que medem a utilização da fonte de carbono, atividade enzimática e a resistência. A suspensão e o inóculo foram preparados, conforme recomendações do fabricante. Os resultados finais estão disponíveis em aproximadamente 10 horas ou menos para os BGN e oito horas ou menos para os CGP. Os critérios para a aceitação da identificação foi estabelecido por um índice de probabilidade superior a 98%. No esquema 2 está representado o fluxo de trabalho de identificação bacteriana que foi realizado neste estudo pelo sistema automatizado VITEK®2.



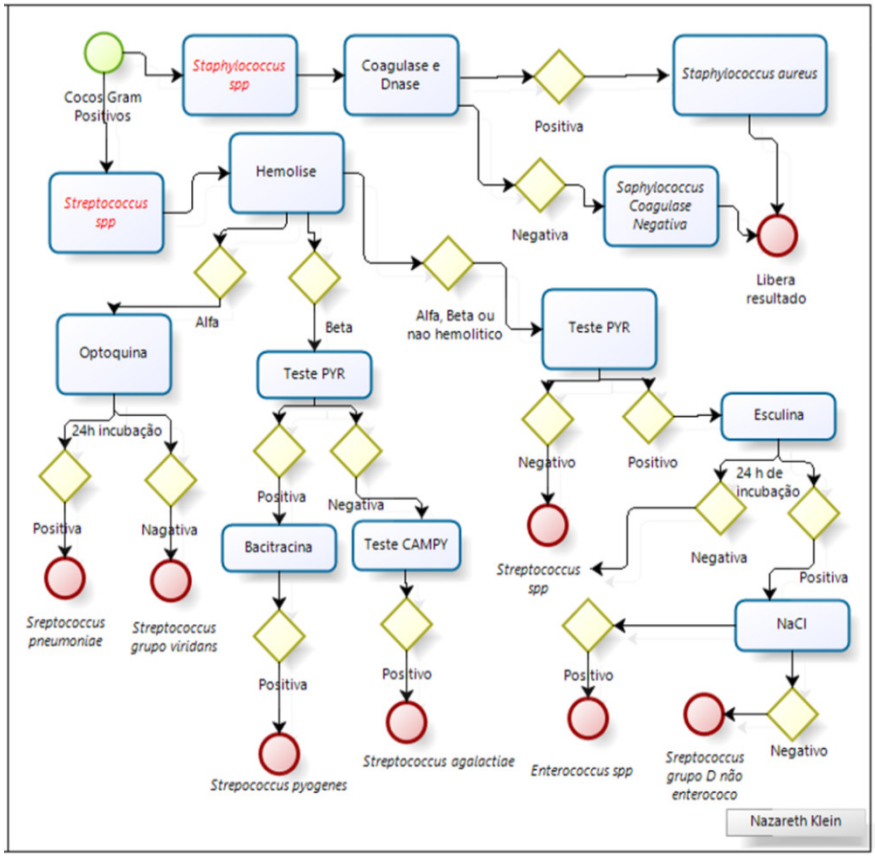
Esquema 2 - Representação esquemática do fluxo de trabalho da identificação bacteriana automatizada com o sistema automatizado *VITEK®2* Systems



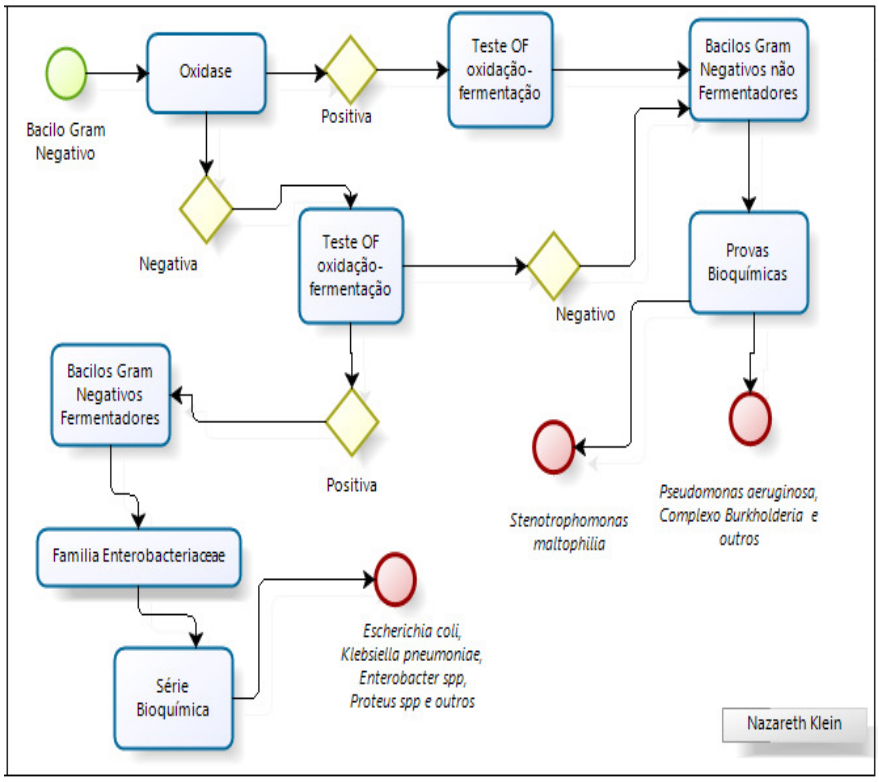
Figura 1 - Cartões de identificação GP VITEK®2 para bactérias Gram-positivas e GN VITEK®2 para bactérias Gram-Negativas (bioMérieux)

3.2.9. Identificação fenotípica convencional

As morfologias macroscópica e microscópica (método de Gram) foram estudadas de acordo com a descrição taxonômica para cada espécie. Quando o índice de probabilidade foi inaceitável pela identificação automatizada pelo VITEK®2 (índice de probabilidade inferior a 98%) foram realizados procedimentos bioquímicos clássicos, conforme tabelas 1, 2 e 3, composta por uma série de meios, que medem diferentes características metabólicas dos microrganismos, estabelecendo um perfil bioquímico para a identificação, conforme descrito por Koneman *et al.*, 2008. A representação esquemática da identificação fenotípica convencional dos BGN-F, BGN-NF e CGP estão representados nos esquemas 3 e 4. Outros testes bioquímicos foram adicionados conforme necessidade, com base nas recomendações de Koneman *et al.*, 2008 e Murray *et al.*, 2006.



Esquema 3 - Representação esquemática da identificação fenotípica convencional dos Cocos Gram-Positivos.



Esquema 4 - Representação esquemática da identificação fenotípica convencional dos Bacilos Gram-Negativos fermentadores e não fermentadores.

3.2.9.1. Bacilos Gram-Negativos

Foram analisadas a morfologia e pureza do cultivo, para fazer a identificação preliminar dos BGN. Foi inicialmente realizado o teste da citocromo oxidase (Probac). O teste negativo classifica o bacilo em BGN-F, com exceção para o complexo *Acinetobacter baumannii* e positivo para os BGN-NF. Foi também realizado a prova de oxidação e fermentação com o meio OF-dextrose (Himedia) (Koneman *et al*., 2008).

3.2.9.1.1. Bacilos Gram-Negativos fermentadores

A bactéria isolada e pura foi submetida as provas bioquímicas de identificação, como demonstrado na tabela 1, após 24 h de incubação a 35-37ºC (Koneman *et al*., 2008).

Tabela 1 – Características fenotípicas para a identificação de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae.*

TESTE	*Escherichia coli*	*Klebsiella pneumoniae*
Indol	+(98)	-(0)
Vermelho de metila	+(98)	-(10)
Citrato Simmons	-(1)	+(98)
H2S	- (1)	- (0)
Urease	- (1)	+ (95)
Motilidade	V (95)	- (0)
Lisina descarboxilase	V(90)	+ (98)
Arginina dihidrolase	V (17)	- (0)
Ornitina descarboxilase	V (65)	- (0)
Fenilalanina-desaminase	- (0)	- (0)
Malonato	- (0)	+ (93)
Dulcitol	V (60)	V (30)
Adonitol	- (5)	V (90)
Inositol	- (1)	+ (95)
D-Sorbitol	V (94)	+ (99)
L-Arabinose	+ (99)	+ (99)
Rafinose	+ (50)	+ (99)
L-Raminose	V(80)	+ (99)

Legenda: “+” reações positivas; “-“ reações negativas e “V” as variáveis. Os números entre parênteses referem-se a percentagem de linhagens que apresentam reações positivas.

3.2.9.1.2. Bacilos Gram-Negativos não fermentadores

Uma das colônias bacterianas foi selecionada para ser submetida aos testes clássicos de identificação, como demonstrado na Tabela 2 (Koneman *et al*.,2008).

Tabela 2 - Características fenotípicas de *Pseudomonas aeruginosa e Acinetobacter baumannii.*

TESTE	*P. aeruginosa*	*A. baumannii*
Crescimento a 42ºC	+	+
Motilidade	+	-
Oxidade	+	-
Pigmento	+	-

Legenda: "+" representa 90% ou mais de linhagens positivas e "-" representa 90% ou mais de linhagens negativas.

3.2.9.2. Cocos Gram-Positivos

Para fazer a identificação preliminar dos CGP, foi realizado o teste da catalase para separar os *Staphylococos* dos *Enterococos.* A coagulase (livre ou conjugada), para classificar os *S. aureus* e os *Staphylococcus* coagulase negativos. O teste positivo de PYR (hidrólise da L-pirrolidonil-beta-naftilamida através da produção da enzima pirrolidonil arilamidase-Probac), foi realizado para confirmar o gênero *Enterococcus*. O esquema 4 mostra o fluxo de trabalho na identificação fenotípica convencional dos CGP. A identificação manual dos enterococos seguiu a Tabela 3 (Teixeira *et al.*, 2007).

Tabela 3 - Características fenotípicas da identificação das espécies de *Enterococcus spp.*

TESTE	*E. faecalis*	*E. faecium*	*E. gallinarum*
Arabinose	-	+	+
Rafinose	-	V	+
MGP	-	-	+
Motilidade	-	-	+ (c)
Arginina	+ (c)	+	+ (c)
Manitol	+	+	+
Sorbitol	+	V	-
Sorbose	-	-	-

Legenda: "+" representa 90% ou mais dos isolados são positivos; "-" representa 90% ou mais dos isolados são negativos e "V" as variáveis (11 a 89% dos isolados são positivos); (c) ocorrência de exceções ocasionais (<3% dos isolados mostram reações atípicas); MGP, metil-α-D-glicopiranosídeo.

3.2.10. Testes de susceptibilidade a antimicrobianos (TSA)

Os testes fenotípicos para avaliação do perfil de suscetibilidade aos ANTs foi realizado pela metodologia automatizada VITEK®2 (*bioMérieux, Marcy l'Etoile, France*), que utiliza o método de microdiluição em caldo e está equipado com programa para a validação

do TSA e a interpretação dos resultados, o Advanced Expert System (AES™) que permite identificar os mecanismos de resistência bacteriana aos ANTs. A detecção do resultado deste teste é realizada por leitura cinética do crescimento bacteriano de modo comparativo entre o poço controle e o poço com as concentrações discriminatórias, em um período pré definido de até 18 horas.

A suspensão e o inóculo foram preparados, conforme recomendações do fabricante, com a utilização do aparelho DensiCHEK Plus (*bioMérieux*). Foram utilizados os cartões do VITEK®2 AST-N105 para os BGN e AST- P585 para os CGP, representados na figura 2. Cada cartão apresenta 64 poços contendo de duas a quatro diluições de cada ANT, as quais geralmente representam as concentrações correspondentes aos limites de sensibilidade e resistência de cada ANT. Dessa maneira, o sistema relata se a bactéria apresentou CIM superior ou abaixo dos limites de resistência ou sensibilidade, respectivamente. O sistema também pode reportar se o valor da CIM encontra-se na categoria intermediária. Por isso, pode-se dizer que os resultados fornecidos por estes sistemas são semi-quantitativos e não substituem as informações fornecidas pelos métodos de sensibilidade que quantificam a CIM.

Em casos específicos, quando o isolado apresentar resistência incomum ao gênero ou multiresistência a diferentes classes de ANTs, também foi realizado o teste de difusão em ágar (disco difusão). No caso de isolamento de *S. aureus* também foi realizado concomitantemente ao TSA a CIM para vancomicina e daptomicina (ambos com gradientes que variam de 0.016 a 256 µg/mL do ANT) por Etest e o teste *screnning* com cefoxitina (30µg/mL), conforme figura 3.

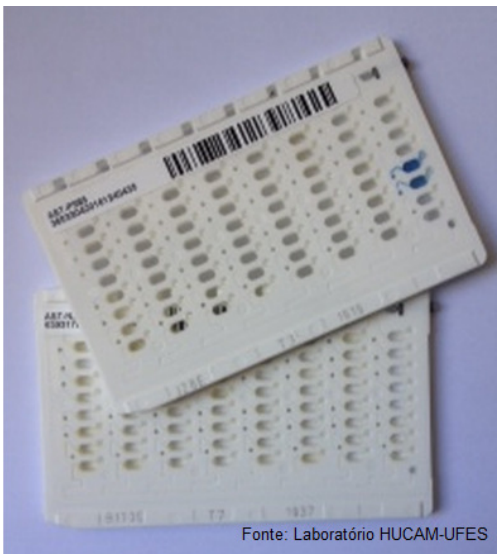


Figura 2 - Cartões de TSA para Gram-Positivo AST-P585 e Gram-Negativo AST-N105 (bioMérieux)

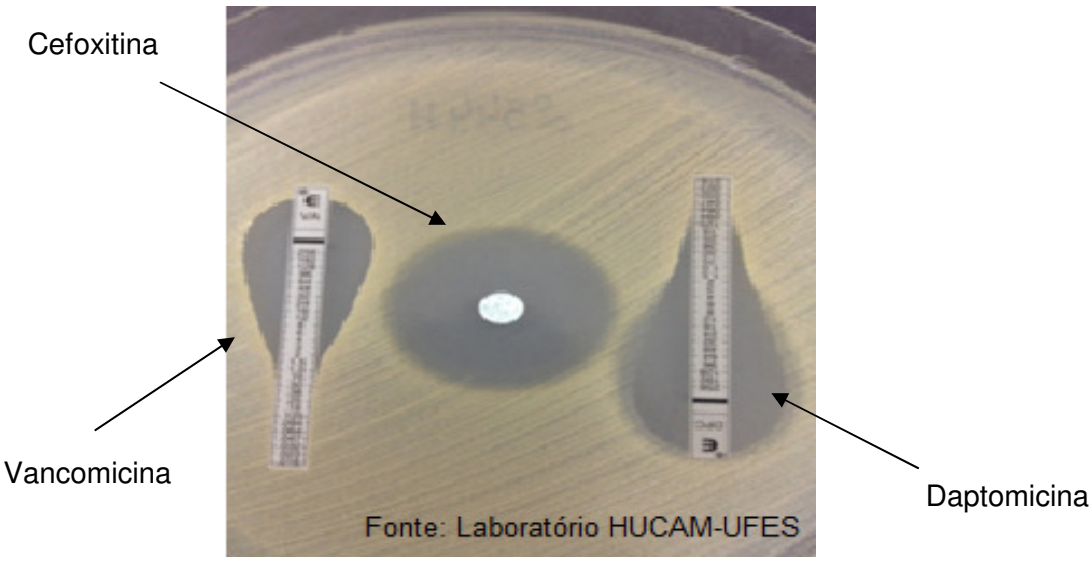


Figura 3 - Determinação da CIMs de vancomicina e daptomicina por Etest e o teste *screnning* com cefoxitina para *S. aureus* em ICS.

3.2.10.1. Teste de difusão em ágar

A susceptibilidade aos ANTs foi determinada através da técnica de difusão em ágar, de acordo com a metodologia descrita por Kirby-Bauer (1966) seguindo as recomendações do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute)* 2011. A partir da cultura pura recente em Ágar Sangue, foram selecionadas de 3 a 5 colônias para a obtenção de uma suspensão padronizada, em solução de salina fisiológica, com turbidez equivalente a do padrão 0,5 na escala de McFarland Standard (bioMérieux/USA) correspondendo a 1,5 x 10^8 UFC/mL. Esta suspensão foi semeada em toda a superfície do meio *Müeller Hinton* Ágar (Merck), com 4.0 ± 0.5mm de profundidade e pH 7,2-7,4, utilizando um *swab* estéril, para obter-se um crescimento semi-confluente. Após no máximo 15 minutos, foram aplicados os discos de ANTs, mantendo-se um espaço de no mínimo, 2,5 cm entre eles.

Foram utilizados discos de papel de filtro impregnados com os seguintes ANTs (*Bio-Rad Laboratories*, *France*): ertapenem (10 µg), meropenem (10 µg), imipenem (10 µg), ceftazidima (30 µg), cefotaxima (30 µg), cefepime (30 µg), cefalotina (30 µg), aztreonam (30 µg), sulfametoxazol-trimetoprim (23,75µg/1,25), ciprofloxacina (5 µg), gentamicina (10 µg), amicacina (30 µg), amoxicilina/ácido clavulânico (20/10), piperacilina/Tazobactam (100/10µg) e polimixina B (300U).

Após aplicação dos discos, os inóculos foram incubados em estufa a 35ºC, por 18-24h. Foram avaliados os diâmetros dos halos de inibição para cada ANT e a interpretação dos resultados foi realizada de acordo com as recomendações da nota técnica da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil (ANVISA, Brasil - nº1/2010) para os carbapenêmicos e do CLSI 2011 para os outros ANTs.

3.2.10.2. Determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) de imipenem, meropenem, ertapenem, polimixina B e tigeciclina

A determinação das CIMs foi realizada através do método de Etest® (AB Biodisk-*BioMérieux*) de acordo com a metodologia descrita pelo fabricante (AB Biodisk 1994). Foram utilizadas fitas de Etest com diferentes concentrações dos seguintes ANTs: polimixina B (0.064-1024 µg/mL), tigeciclina (0.015-256 µg/mL), ertapenem (0.002-32 µg/mL), meropenem (0.002-32 µg/mL) e imipenem (0.002-32 µg/mL). A interpretação dos resultados dos carbapenêmicos, polimixina B e tigeciclina, foram realizadas de acordo com as recomendações da nota técnica nº1/2010 da ANVISA.

3.3. Controle de Qualidade

3.3.1. Periodicidade

O controle de qualidade (CQ) dos meios de cultura utilizados no cultivo, identificação e TSA dos microrganismos envolvidos neste estudo, foram realizados após o preparo de cada lote de meio. Para o CQ dos painéis utilizados pelo VITEK®, foram realizados testes mensalmente ou a cada lote adquirido de painéis, conforme recomendação do fabricante. O CQ das fitas Etest frente a diferentes antimicrobianos, foi realizado a cada lote adquirido ou para confirmação de linhagens bacterianas resistentes.

3.3.2. Linhagens bacterianas utilizadas

Foram utilizadas as linhagens ATCC: *S. aureus* ATCC 29213, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faeacalis* ATCC 29212, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 para o sistema automatizado VITEK 2 ®. Para o CQ do ágar Mueller-Hinton (Merck-*United States* ou Oxoid-*England*), preparados *in house* utilizou-se *S. aureus* ATCC 29923, *E. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 27853. Para o CQ dos meios de cultivo e meios em tubos destinados as provas bioquímicas clássicas, preparados *in house*, foi utilizado linhagens bacterianas locais, bem identificadas e conservadas em Ágar Nutriente (Oxoid--*England*), inclinadas em tubos, repicadas periodicamente para manter a sua viabilidade.

3.3.2.1. Meios de cultura utilizados e leitura

Para o CQ do TSA, as ATCC foram semeadas em toda a superfície do Ágar *Mueller-Hinton* conforme descrito no item 3.2.10.1**,** utilizando todos os discos de ANTs utilizados na rotina microbiológica. Os inóculos foram incubados em estufa bacteriológica a 35-37ºC por 24h, para promover o crescimento bacteriano. A leitura foi realizada conforme CLSI, 2011. Para o CQ do sistema automatizado VITEK 2 ® foram utilizados os painéis do sistema

(Gram-Positivos e Gram-Negativos), conforme recomendações do fabricante. Para os testes das provas bioquímicas a leitura foi realizada conforme descrito por Koneman *et al.,* 2008.

3.3.3. Testes fenotípicos para a detecção dos genes de resistência em Bacilos Gram-Negativos

3.3.3.1. Detecção fenotípica de ESBL *(Extended spectrum beta-lactamase)*

Para a detecção fenotípica da produção de beta lactamases de espectro estendido conhecidas como ESBL, foi empregado o teste de Jarlier *et al.,*1988 e as recomendações do CLSI 2011. A suspensão e o inóculo foram preparados da mesma maneira como no teste de susceptibilidade a ANTs, descrito no item 3.2.10.1. Foi colocado no centro de uma placa um disco de amoxicilina/ácido clavulânico (20/10 µg) e em torno deste disco, foram colocados os discos de ceftazidima (30 µg), cefotaxima (30 µg), cefepime (30 µg) e ceftriaxona (30 µg), a uma distância de 2cm. Todos os discos empregados foram da Bio-Rad.

A suspeita de produção de ESBL foi observada quando houve o aumento do diâmetro do halo de inibição ou o aparecimento da zona fantasma, distorção do halo ao redor do disco beta-lactâmico, como demonstrado na figura 4.

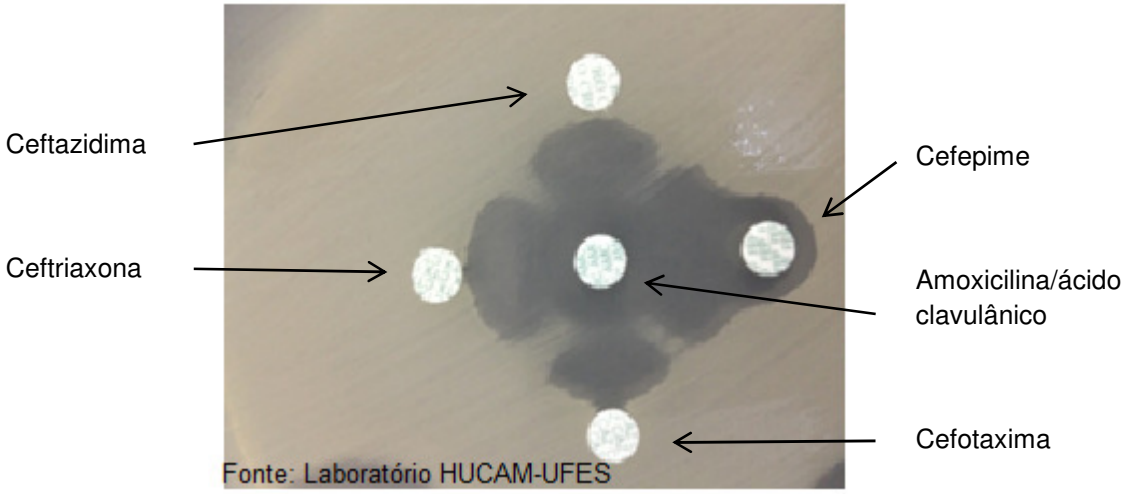


Figura 4 - Teste de aproximação em discos de uma linhagem de *Klebsiella pneumoniae* para confirmação do fenótipo de ESBL.

3.3.3.2. Teste de Hodge modificado

Foi preparado um inóculo da linhagem *E. coli* ATCC 25922, correspondente a 0,5 da escala de McFarland, por meio do método de crescimento ou da suspensão direta da colônia. Fez-se o TSA por disco-difusão semeando a linhagem de *E. coli* ATCC 25922 em uma placa de ágar *Müeller-Hinton* (Merck) e colocou-se no centro da placa um disco de meropenem de 10 µg (Bio Rad).

Com auxílio de uma alça, foi estriado a partir do disco de meropenem até a periferia da placa de Petri a linhagem bacteriana em teste, com o cuidado para não tocar no disco de meropenem. Da mesma maneira foi estriado como controle negativo a *K. pneumoniae* ATCC 700603, conforme ilustrado na figura 5. Após incubação a temperatura de 35-37ºC, por 16 a 18 horas, foi observado o crescimento da *E. coli* ATCC 25922 no halo de inibição do meropenem (distorção do halo de inibição). A linhagem de *E. coli* ATCC 25922 é sensível ao meropenem e este crescimento só foi possível porque a amostra teste produziu uma enzima que foi capaz de inativar o meropenem. Não ocorreu distorção do halo, onde a linhagem de *K. pneumoniae* ATCC 700603 foi semeada (Anderson *et al*.,2007).

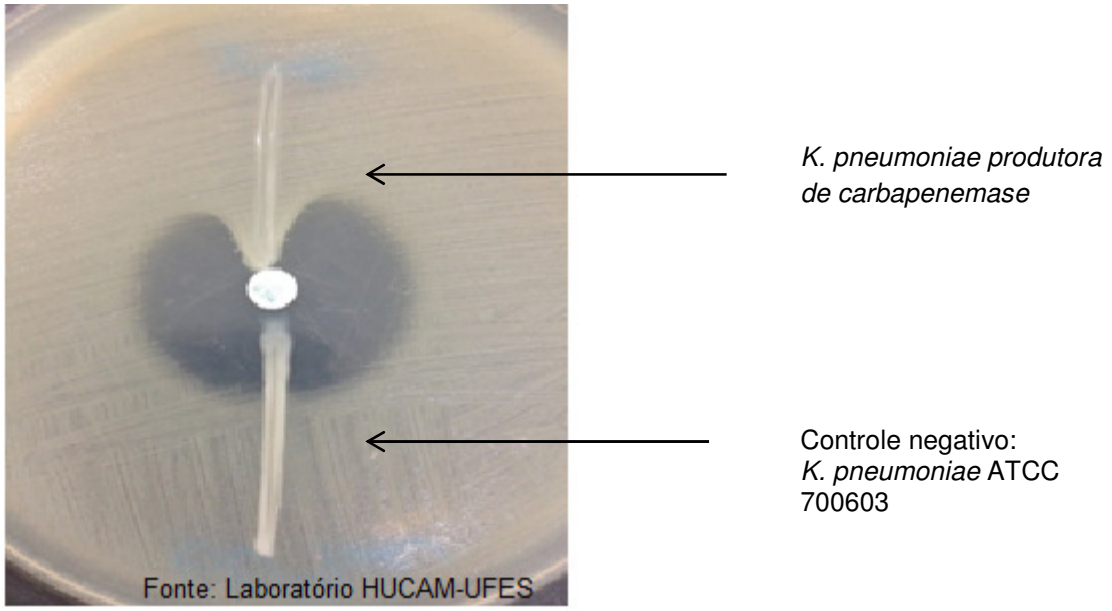


Figura 5 - Distorção do halo de inibição que é indicativa de carbapenemase pela amostra de *Klebsiella pneumoniae* testada

3.3.3.3. Teste fenotípico para detecção da produção de metalo beta-lactamases

A detecção de metalo beta-lactamase (MBLs) foi realizada pelo método de disco-aproximação, proposto por Arakawa *et al.,* 2000 e o método do disco combinado (Picão *et al*., 2008). A partir de cultura recente foram selecionadas de 3 a 5 colônias para obtenção de uma suspensão padronizada, em solução salina esterilizada, com turbidez equivalente a do padrão 0,5 na escala de McFarland. Esta suspensão foi semeada em toda a superfície do meio ágar *Mueller-Hinton*, como recomendado pelo CLSI 2011, a fim de se obter um crescimento confluente e homogêneo. Nesta placa foram realizadas as duas metodologias ao mesmo tempo, conforme figura 6. Como controle positivo e negativo foram utilizadas as amostras de *P. aeruginosa* BAC163 e *P. aeruginosa* ATCC 27853, respectivamente.

3.3.3.3.1. Método de disco aproximação para detecção da produção de MBLs.

Para detecção presuntiva da produção de MBLs **f**oram aplicados um disco de ceftazidima 30µg (Bio-Rad) e um disco de imipenem 10µg (Bio-Rad), mantendo-se uma distância de 2 cm entre eles e um disco de papel de filtro entre estes dois discos (2cm de distância entre os centros dos discos). No disco não impregnado foram aplicados 5µL de solução de ácido 2-mercaptopropiônico (MPA, Sigma), diluída na proporção 1:8 ou o ácido etileno diamino tetracético a 0,5 M (EDTA, Vetec), como inibidores de metalo beta-lactamase. Os inóculos foram incubados em aerobiose a 35 - 37°C por 18 - 24h. Em amostras produtoras de metalo beta-lactamase, observa-se uma distorção do halo de inibição, com a ampliação da zona de inibição de crescimento da amostra bacteriana.

3.3.3.3.2. Método de disco combinado para detecção da produção de MBLs

Foram aplicados três discos de ceftazidima 30µg (Bio-Rad) e três discos de imipenem 10µg (Bio-Rad), mantendo-se uma distância de 3 cm de distância entre os discos. Foram adicionados 5 µl de solução EDTA 0,5 M e 5 µl de uma solução de MPA, diluída na proporção 1:8 nos discos acima, deixando um disco de cada ANT sem as soluções, considerado controle negativo. A amostra teste foi considerada produtora de MBL quando uma diferença de 5mm ou mais foi observada entre os diâmetros da zona de inibição, nos discos com as soluções, comparadando-se aos discos sem as soluções inibidoras.

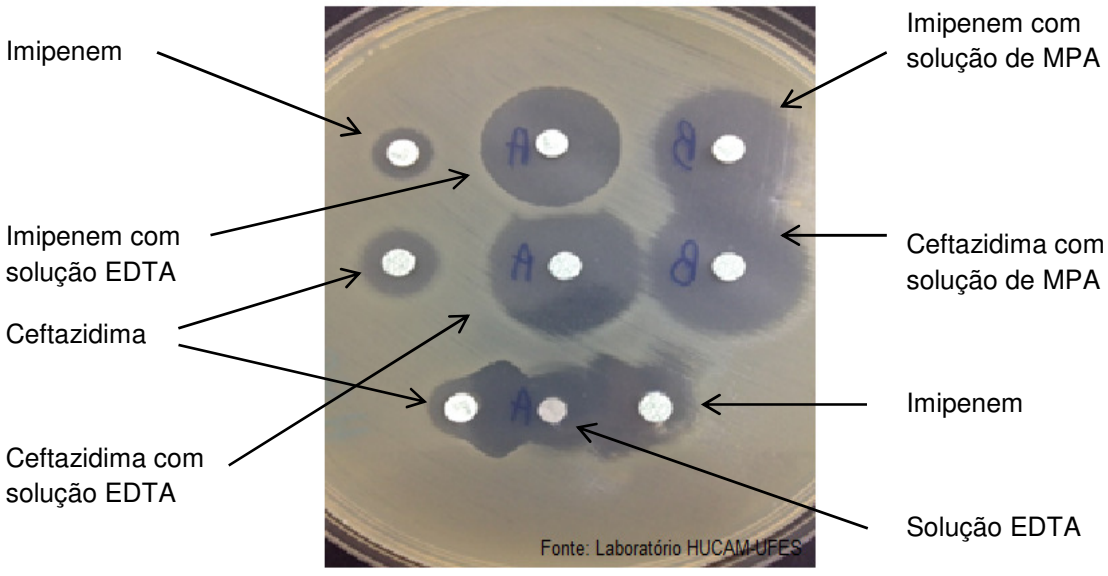


Figura 6 - Teste fenotípico positivo da produção de metalo beta-lactamases

3.3.4. Teste fenotípico para a detecção de resistência a oxacilina em *Staphylococcus* spp.

O teste de disco difusão a partir do disco de cefoxitina (30µg) foi realizado para todas as amostras de *Staphylococcus* spp. conforme recomendações do CLSI 2011. As linhagens bacterianas após 24h de crescimento em Ágar sangue a 35ºC, foram diluídas em salina estéril a 0,85% até a obtenção de uma solução bacteriana, com turbidez equivalente a 0,5 da escala McFarland. Esta solução foi semeada de maneira confluente, com auxílio de um "*swab"* em ágar Mueller-Hinton. Sobre o meio de cultura foi depositado o disco de cefoxitina (30 µg), fornecido pela Oxoid (Cambrigde, UK). A leitura do halo de inibição foi realizada após 24h de incubação a 35ºC. A interpretação seguiu os critérios estabelecidos pelo CLSI 2011. A linhagem da ATCC 25923 foi utilizada como CQ para este ANT.

3.3.5. Testes fenotípicos para a detecção de resistência a vancomicina em *Enterococcus* spp.

Nas linhagens de *Enterococcus* spp. que foram resistentes a vancomicina pelos testes de disco difusão e/ou pela metodologia automatizada, foi utilizado fitas Etest com gradiente do ANT para a determinação da CIM. As suspensões bacterianas foram ajustadas segundo a escala padrão 0,5 de McFarland. Em seguida, essas suspensões bacterianas foram semeadas no ágar *Mueller-Hinton*, com um *swab* estéril, em toda superfície do meio de cultura. Após 5 a 15 minutos, a fita de Etest de vancomicina com concentrações entre 0.016 - 256 µg/mL foram depositadas com auxílio de uma pinça estéril com a face que contém o ANT voltado para a superfície do ágar. As placas foram colocadas em estufa a 35℃ por 24 horas. A leitura foi realizada para determinação da CIM que é obtida com o ponto de interseção entre a fita e a zona de inibição do crescimento do microrganismo, que assume a forma elíptica e interpretada segundo CLSI, 2011.

3.4. Testes genotípicos

Os testes foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ (LAPIH) que participa da Rede de Monitoramento da Resistência a Antimicrobianos da ANVISA e recebe amostras bacterianas de diferentes Estados do Brasil, para confirmação dos mecanismos de resistência.

3.4.1. Detecção de genes de resistência pela técnica de PCR

Os testes para detecção de genes de resistência por técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) e análise da diversidade genética através da técnica de análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico após eletroforese em campo pulsado

(PFGE), para os BGN, foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar do Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ (LAPIH), Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

Os testes para detecção de genes de resistência por técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) para os CGP, selecionados nesta pesquisa (*S. aureus, E. faecium* e *E. gallinarium*), foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular e Virulência Bacteriana do Departamento de Patologia, setor de Microbiologia no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Vitória-ES, Brasil.

3.4.1.1. Extração do DNA bacteriano

A extração do DNA bacteriano por sonicação foi realizada a partir de um cultivo recente (24horas) em placa de ágar nutriente (Oxoid) das linhagens de BGN incluídas no estudo. Foram selecionadas colônias bacterianas isoladas com auxílio de alça descartável e adicionadas a um microtubo do tipo *eppendorf* contendo 200 µL de água Milli-Q, até a obtenção de uma suspensão padronizada, com turbidez equivalente ao padrão 3.0 na escala de McFarland. A amostra foi homogeneizada por 30 segundos em vortex (Vortex Genie 2-Daigger). Após, as células foram lisadas, utilizando-se sonicador (Cristófoli), com objetivo de romper a parede celular e a membrana plasmática bacteriana para liberação do DNA. A sonicação ocorreu em duas etapas de 30 segundos, intercaladas com uma pausa de 10 segundos. Os debris celulares foram precipitados através de centrifugação a 4ºC (Centrífuga Sorvall) a 13.000 rpm durante 1 minuto. As amostras foram utilizadas nas reações de PCR após a extração ou foram armazenadas em freezer a -20ºC até o momento do processamento. A liberação do DNA bacteriano nos CGP foi realizada de acordo com Schuenck *et al*., 2008 com modificações. Cinco a seis colônias de cada amostra cultivada em ágar sangue (*Blood Agar Base*, Himedia, com 5% de sangue de carneiro) foram suspensas em 100µL de água estéril deionizada e aquecidas a 100ºC por 15 minutos. Após centrifugação de 15.000 rpm por 30 segundos, o sobrenadante com DNA liberado foi coletado para ser utilizado na reação de PCR.

3.4.1.2. Reação de amplificação dos genes de resistência

Foi realizada a pesquisa de 19 diferentes genes de resistência (tabela 4, 5, 6, 7 e 8), nos microrganismos selecionados neste trabalho.

Nos BGN-F incluído em nosso estudo (*K. pneumoniae* e *E. coli)* que apresentaram teste fenotípico positivo para a produção de ESBL, foram realizadas reações em cadeira da polimerase (PCR) para a detecção dos seguintes genes: genes codificadores dessas enzimas: bla_{SHV}, bla_{TEM}, $bla_{CTX\text{-}M}$ (iniciadores para detecção do grupo CTX-M e iniciadores específicos para CTX-M-15). Em três isolados de *K. pneumoniae* (uma positiva para o teste de Hodge e duas positivas para teste fenotípico para detecção de metalo beta-lactamases,

foi realizada também pesquisa de genes codificadores das carbapenemases *bla*$_{KPC}$ e *bla*$_{NDM}$ Estas três amostras foram isoladas de pacientes, sem apresentação de melhora clínica com uso de meropenem por 10 dias. Nas duas amostras, negativas para o teste de Hodge também foi realizado PCR para o gene *bla*$_{OXA-48.}$ O teste fenotípico para a produção de ESBL, o teste de Hodge e de metalo beta-lactamases, foram realizados, segundo a metodologia descrita nos itens 3.3.3.1, 3.3.3.2, 3.3.3.3 respectivamente. Foram utilizados os primers (oligonucleotídeo) e condições das reações descritas nas tabelas 4 e 5.

Nos BGN-NF (*Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii)*, resistentes aos carbapenêmicos, foram realizadas diferentes reações de PCR. Para linhagen de *P. aeruginosa,* foi pesquisado os genes *bla*$_{SPM-1,}$ *bla* $_{IMP1,}$ *bla*$_{VIM1,}$ *bla* $_{VIM2}$, *bla*$_{KPC,}$ e*bla*$_{NDM.}$ Nas *cepas de A. baumanni,* foram pesquisados genes codificadores de oxalicinases através da reação PCR do tipo Multipex para os cincos grupos de oxacilinases mais frequentemente descritos nesse gênero *bla*$_{OXA-23}$, *bla*$_{OXA-24,}$ *bla*$_{OXA-51,}$ *bla*$_{OXA-58,}$ *bla*$_{OXA-143}$. Foram utilizados os primers (oligonucleotídeo) e condições das reações descritas nas tabelas 6 e 7.

Para os CGP, selecionados nesta pesquisa foram realizados a pesquisa de 04 diferentes genes de resistência. Em isolados de *S. aureus* resistentes a meticilina (oxacilina), foi realizado a pesquisa do gene de resistência *mecA* e nos isolados de *E. faecium* e *E. gallinarium* resistentes a vancomicina, foi realizado a pesquisa dos genes *vanA, vanB* e *vanC.* Foram utilizados os primers (oligonucleotídeo) *e* condições das reações descritas na tabela 8.

A preparação de todas as soluções mãe (máster mix) para os BGN foram realizadas em cabine de segurança para PCR. Em cada reação, utilizou-se água deionizada estéril, JumpStart REDtaq Ready Mix (Sigma), além dos primers (20pmol/µL). O JumpStart REDtaq ReadyMix da Sigma é uma mix que contém todos os constituintes para a reação de PCR ocorra, substituindo assim o preparo da reação adicionando cada constituinte. O mix é composto por Tris-HCl (20mM, pH 8,3) KCl (100 mM), MgCl2 (4 mM), 0,002% de gelatina, dNTP (dATP, dCTP, dGTP, TTP)(0.4 mM de cada), corante inerte, Taq DNA Polymerase (0.06 U/uL). Os primers liofilizados foram adquiridos pela empresa Gene Link e ressuspendidos no LAPIH a 200pmol/µL.

A reação PCR foi do tipo Multipex para os dois grupos de carbapenemases: genes *bla*$_{KPC}$, *bla*$_{NDM,}$ foi preparada em um volume final de 25 µL contendo 2 µL de DNA total, 9.5 µL de água Milli-Q, 12,5 µL do "JumpStart REDTaq ReadyMix Reaction Mix" (Sigma) e 0,5 µL (25 pmoles) de cada primer (2 pares de primers ao todo). Foram utilizados os primers (oligonucleotídeo) e condições das reações descritas na tabela 4.

A mistura da PCR para detecção do gene *bla*$_{OXA-48,}$ foi preparada em um volume final de 23 µL contendo 2 µL de DNA total, 9 µL de água Milli-Q, 12,5 µL do "JumpStart REDTaq

ReadyMix Reaction Mix" (Sigma) e 0,75 µL (20 pmoles) de cada iniciador. Foram utilizados os primers (oligonucleotídeo) e condições da reação descrita na tabela 4.

A mistura para reação de PCR para detecção dos genes *bla*$_{CTX-M}$, *bla*$_{SHV}$ e *bla*$_{TEM}$ foi preparada em um volume final de 25 µL contendo 1 µL de DNA total, 14,25 µL de água Milli-Q (água ultra pura), 5 µL do tampão PCR 5X, 1,25 µL de cada iniciador (20pmoles/µL) 0,5 µL da mistura de deoxinucleotídeos (10 mM), 1,5 µL de solução $MgCl_2$ (25 mM) e 0,25 µL de Go*Taq*Flexi DNA polymerase (5 U/µl) (Promega). A mistura da PCR para detecção do gene *bla*$_{CTX-M-15}$ foi preparada em um volume final de 25 µL contendo 1 µL de DNA total, 9,5 µL de água Milli-Q, 12,5 µL do "JumpStart REDTaq ReadyMix Reaction Mix" (Sigma) e 1 µL (25 pmoles) de cada iniciador foram utilizados os primers (oligonucleotídeo) e condições das reações descritos na tabela 5.

Para o multiplex PCR de *A. baumannii*, o volume final para uma reação foi de 23 uL. Para cada reação foram usados 8 uL de H2O ultra purificada, 12,5 uL do mix JumpStart REDtaq ReadyMix e 0,25 uL de cada primer (5 pares de primers ao todo). O DNA extraído segundo o item 3.4.1.1.foi adicionado a reação, completando 25 uL, ocorrendo a reação em termociclador com os ciclos descritos na tabela 6.

A mistura da PCR para detecção dos genes *bla*$_{SPM-1,}$ *bla* $_{IMP2,}$ *bla* $_{IMP4,}$ *bla* $_{VIM1,}$ foi preparada em um volume final de 23 µL contendo 2 µL de DNA total, 9 µL de água Milli-Q, 12,5 µL do "JumpStart REDTaq ReadyMix Reaction Mix" (Sigma) e 0,75 µL (20 pmoles) de cada iniciador. Foram utilizados os primers e condições das reações descritas na tabela 7.

Todas as reações de PCR para os BGN foram realizadas em termociclador T 100 Thermal Cycler (Bio-Rad).

A reação de PCR para detecção do gene *mecA*, foi utilizado o par de oligonucleotídeos *mecA* P4 e *mecA* P7, responsável pela amplificação do fragmento do gene *mecA* (Oliveira e de Lencastre, 2002), utilizando-se um volume final de 50 µL constituídos por: 1 µL de DNA total, tampão da enzima (10mM de Tris-HCl e 25 mM de KCl), 3 mM de MgCl2, 200 µM de cada desoxinucleotídeo trifosfatado (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (Invitrogen, Life Technologies, Califórnia, EUA), 2,0 U de Taq DNA polimerase (Biotools, Madri, Espanha) e 20 pmoles dos oligonucleotídeos *mecA* P4 e *mec*A P7 (Invitrogen, Life Technologies, Califórnia, EUA). Foram utilizados os primers (oligonucleotídeo) e condições das reações descritas na tabela 8.

A reação de PCR para detecção dos genes *vanA, vanB e vanC* para os enterococos, foi do tipo Multipex, realizada utilizando uma alíquota de 3µL do produto de extração adicionada a mistura da reação de PCR, que incluía 30 pmol de cada par de primer, 400 µM de cada desoxinucleotídeo trifosfatado (dATP, dGTP, dCTP e dTTP) (Life Technologies, SP, Brasil), 2,5 µL do tampão 10x (10 mM Tris HCl, 25mM KCl), 2 mM de $MgCl_2$, 1,5 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen, CA, EUA) e água deionizada estéril para um volume final de

50µL. Foram utilizados os primers (oligonucleotídeo) e condições das reações descritos na tabela 8.

Todas as reações de PCR para amplificação do fragmento de DNA nos CGP foram realizadas em termociclador Veriti 96-Well Thermal Cycler, Applied Biosystems, Life Technologies, Califórnia, EUA.

Os produtos de PCR de cada gene foram submetidos à eletroforese, como descrito no item 3.4.1.3.

3.4.1.3. Eletroforese em gel de agarose e fotodocumentação

A amplificação do DNA genômico pela técnica de PCR nos BGN foi visualizada através de eletroforese em gel de agarose a 1,5% em TBE 0,4X (EDTA 0,5M pH 8,0; Tris 1M pH 8,0; Ácido Bórico 0,035M). A eletroforese foi realizada com tampão de corrida TBE 0,4X sob uma corrente de 100 Volts por quarenta minutos. Após a corrida eletroforética, o gel foi corado com brometo de etídio (0,5 g/L) e observado sob luz ultravioleta (UV) em equipamento L-pix Molecular Imaging (Loccus Biotecnologia). Os tamanhos dos produtos de PCR obtidos pelas amostras foram comparados com os tamanhos das amostras controle, de modo a diferenciar entre as amostras positivas e negativas.

Nos CGP, o produto da reação de PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 2,5% para o *S.aureus* e 1,5% para os enterococos, em TBE 0,5X (Tris 0,89 M, ácido bórico 0,89 M, EDTA 2,5 mM, pH 8,2). Após corrida de 2h a 100 V para o *S.aureus* e 1h a 120V para os enterococos, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5µg/mL) (Hexapur, Amsterdam, Holanda)por cinco minutos e a imagem capturada sob luz UV em um fotodocumentador (MiniBIS Pro, BioImaging *Systems*). Como padrão de DNA, foi utilizado o marcador 100 pb DNA *ladder* (Invitrogen, Life Technologies, Califórnia, EUA).

Tabela 4 - Iniciadores e condições específicas das reações de PCR para detecção dos genes codificadores de resistência a carbapenêmicos em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*.

Região alvo	Sequência do iniciador (5' → 3')	Tamanho do produto (pb)	Referência Bibliográfica	Condições da reação *in house*
***bla*$_{KPC}$**	**KPC-F-** CGGTTACGGCCAGTGGGAATA **KPC-R-** GACGCAGACCGAATCGAACT	1011	Peirano *et al.*, 2009	Desnaturação inicial: 94ºC / 5 min 30 ciclos: desnaturação (94ºC / 25 seg), anelamento (56ºC / 40 seg) e extensão (72ºC / 50 seg). Extensão final (72ºC / 6 min)
***bla*$_{NDM}$**	**NDM-F-** GGTTTGGCGATCTGGTTTTC **NDM-R-** CGGAATGGCTCATCACGATC	608	Carvalho-Assef *et al.*, 2013	
***bla*$_{OXA48}$**	**OXA-48-F-** TTGGTGGCATCGATTATCGG **OXA-48-R-** GAGCACYYCTTTTGTATGGC	755	Poirel *et al.*, 2010	Desnaturação inicial: 94ºC / 5 min 34 ciclos: desnaturação (94ºC / 45 seg), anelamento (57ºC / 45 seg) e extensão (72ºC / 45 seg). Extensão final (72ºC / 5 min)

Tabela 5 - Iniciadores e condições específicas das reações de PCR para detecção dos genes codificadores de ESBLs em *Escherichia coli e Klebsiella pneumoniae.*

Região alvo	Sequência do iniciador (5' → 3')	Tamanho doproduto (pb)	Referência Bibliográfica	Condições da reação *in house*
bla_{CTX-M}	**CTX-F-** ATGTGCAGYAACCAGTAARGTKATGGC **CTX-R-** TGGGTRAARTARGTSACCAGAAYCAGCGG	593	Mulvey *et al.*, 2003	Desnaturação inicial: 94ºC / 5 min 30 ciclos: desnaturação (94ºC / 1 min), anelamento (60ºC / 1 min), extensão (72ºC / 1 min), Extensão final (72ºC / 10 min)
$bla_{CTX-M-15}$	**CTX-M-15-F-** TCCGTTTCCGTCATTACAAAC **CTX-M-15-R-** ACCGTCGGTGACGATTTTAG	875	Mendonça *et al.,* 2007	Desnaturação inicial: 94ºC / 5 min 30 ciclos: desnaturação (94ºC / 1 min), anelamento (50ºC / 1 min) e extensão (72ºC / 1 min) Extensão final, (72ºC / 5 min)
bla_{SHV}	**SHV-F-** TTATCTCCCTGTTAGCCACC **SHV-R-** GATTTGCTGATTTCGCTCGG	797	Hasman *et al.*, 2005	Desnaturação inicial: 94ºC / 10 min 30 ciclos: desnaturação (94ºC / 40 seg), anelamento (60ºC / 40 seg) e extensão (72ºC / 1 min). Extensão final (72ºC / 7 min)
bla_{TEM}	**TEM-F-** GCGGAACCCCTATTTG **TEM-R-** ACCAATGCTTAATCAGTGAG	859		

Tabela 6 - Iniciadores e condições específicas das reações de PCR Multiplex, para detecção dos genes de resistência codificadores de Oxacilinases em *Acinetobacter baumannii.*

Região alvo	Sequência do iniciador (5' → 3')	Tamanho do produto (pb)	Referência Bibliográfica	Condições da reação *in house*
bla **OXA-23**	**OXA-23-F** ACTTGCTATGTGGTTGCTTCTC **OXA-23-R** TGTCAAGCTCTTAAATAATATTCAGC	501	Higgin *et al*., 2010	Desnaturação inicial: 94ºC / 5 min 29 ciclos: desnaturação (94ºC / 25 seg), anelamento (52ºC /40 seg) e extensão (72ºC / 50 seg). Extensão final (72ºC / 6 min)
bla **OXA-24**	**OXA-24-F** GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA **OXA-24-R** AGTTGAGCGAAAAGGGGATT	246		
bla **OXA-51**	**OXA-51-F** TAATGCTTTGATCGGCCTTG **OXA-51-R** TATGCTTTGATCGGCCTTG	353		
bla **OXA-58**	**OXA-58-F** AAGTATTGGGGCTTGTGCTG **OXA-58-R** CCCCTCTGCGCTCTACATAC	599		
bla **OXA-143**	**OXA-143-F** TGGCACTTTCAGCAGTTCCT **OXA-143-R** TAATCTTGAGGGGGCCAACC	149		

Tabela 7 - Iniciadores e condições específicas das reações de PCR para detecção dos genes codificadores de resistência a carbapenêmicos em *Pseudomonas aeruginosa.*

Região alvo	Sequência do iniciador (5' → 3')	Tamanho do produto (pb)	Referência Bibliográfica	Condições da reação *in house*
***bla*$_{SPM-1}$**	**SPM-1-F** CCTACAATCTAACGGCGACC **SPM-1-R** TCGCCGTGTCCAGGTATAAC	649	Gales *et. al*., 2003	Desnaturação inicial: 95ºC / 5 min 29 ciclos: desnaturação (95ºC / 1 min), anelamento (56ºC /1 min) e extensão (72ºC / 1 min). Extensão final (72ºC / 1 min)
***bla*$_{IMP}$**	**IMP1-F-** CTACCGCAGCAGAGTCTTTG **IMP1-R-** AACCAGTTTTGCCTTACCAT	586	Senda *et al*., 1996	Desnaturação inicial: 94ºC / 5 min 30 ciclos: desnaturação (94ºC / 1 min), anelamento (50ºC /1 min) e extensão (72ºC / 15 seg). Extensão final (72ºC / 5 min)
***bla*$_{VIM-1}$**	**VIM1-F-** GTTTGGTCGCATATCGCAAC **VIM1-R-** AGACCGCCCGGTAGAC	580	Tsakris *et al*., 2000	
***bla*$_{VIM-2}$**	**VIM2-F-** GTTTGGTCGCATATCGCAAC **VIM2-R-** CTACTCAACGATTTTGT	644	Poirel *et al*., 2000	

continuação

Região alvo	Sequência do iniciador (5' → 3')	Tamanho do produto (pb)	Referência Bibliográfica	Condições da reação *in house*
***bla*$_{KPC}$**	**KPC-F-** CGGTTACGGCCAGTGGGAATA **KPC-R-** GACGCAGACCGAATCGAACT	1011	Peirano *et al.*, 2009	Desnaturação inicial: 94ºC / 5 min 30 ciclos: desnaturação (94ºC / 25 seg), anelamento (56ºC / 40 seg) e extensão (72ºC / 50 seg). Extensão final (72ºC / 6 min)
***bla*$_{NDM}$**	**NDM-F-** GGTTTGGCGATCTGGTTTTC **NDM-R-** CGGAATGGCTCATCACGATC	608	Carvalho-Assef *et al.*, 2013	

Tabela 8 - Iniciadores e condições específicas das reações de PCR para detecção dos genes de resistência nos Cocos Gram-Positivos: *S. aureus, E. faecium e E. gallinarium.*

Região alvo	Sequência do iniciador (5' → 3')	Tamanho do produto (pb)	Referência Bibliográfica	Condições da reação *in house*
vanA	***vanA*-F-** GGGAAAACGACAATTGC ***vanA*-R-** GTACAATGCGGCCGTTA	732	Depardieu *et al.,* 2004	Desnaturação inicial: 94ºC /3 min. 30 ciclos: desnaturação (94ºC /1 min.), anelamento (54ºC / 1 min.) e extensão (72ºC / 1 min). Extensão final (72ºC / 7 min)
vanB	***vanB*-F-** ACGGAATGGGAAGCCGA ***vanB*-R-** TGCACCCGATTTCGTTC	647		
vanC	***vanC*-F-** ATGGATTGGTAYTKGTAT ***vanC*-R-** TAGCGGGAGTGMCYMGTAA	815		

continuação

Região alvo	Sequência do iniciador (5' → 3')	Tamanho do produto (pb)	Referência Bibliográfica	Condições da reação *in house*
mecA	***mecA*-F-** AAAATCGATGGTAAAGG TTGGC ***mecA*-R-** AGTTCTGCAGTACCGGA TTTGC	162	Oliveira e de Lencastre, 2002	Desnaturação inicial: 94ºC /4 min. 30 ciclos: desnaturação (94ºC /30 seg), anelamento (53ºC /30 seg.) e extensão (72ºC / 1 min). Extensão final (72ºC / 4 min)

3.4.2. Estudo da diversidade genética através de técnica de análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico após PFGE

A análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico das amostras de *E. coli, K. pneumoniae, P. aeruginosa* e *A. baumannii* foram realizadas de acordo com Ribot e colaboradores, 2006.

As linhagens bacterianas selecionados neste estudo estavam congeladas em Caldo BHI (*Brain Heart Infusion*- Difco, com 20% glicerol (v/v) a -20° C) e foram semeados por estriamento, em Ágar Eosina-Azul de metileno (EMB-Difco), que é o meio adequado para a detecção e diferenciação de bactérias Gram-Negativas. Os inóculos foram incubados a 35-37ºC por 18-24 horas, para obtenção de colônias isoladas e puras.

Para a extração de DNA total, as amostras foram semeadas em tubo contendo ágar nutriente (Oxoid) inclinado e incubadas a 35-37ºC por 24 horas para se obter o crescimento bacteriano. Após a incubação, as amostras bacterianas foram suspensas em 1mL de BSC (EDTA 0,5M pH 8,0, TRIS-HCl 1M pH 8,0) até alcançar a turvação 3 na escala de McFarland. Em seguida, foram colocados 200 µL desta suspensão em um microtubo tipo *eppendorf* e adicionados 5 µL de proteinase K (Sigma - 50 mg/ µL). Os microtubos foram homogeneizados com a própia ponta da ponteira da pipeta automática, que adicionou a proteinase K. Depois foram adicionados a esta suspensão de células, 200 µL de agarose 1% (0,1g de agarose *low melting*- SeaKem Gold Agarose, 0,5 mL de SDS 1%, 9,4 mL de TE [TRIS-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 0,1 MM pH 8,0]). A mistura foi homogeneizada e distribuída em moldes.

Após a solidificação dos blocos de agarose contendo DNA bacteriano total (chamados plugs), os mesmos foram transferidos para tubos Falcon de 15mL contendo 2

mL de solução de lise (Trisma base 1,0 M pH 8,0/ EDTA 0,5 M pH 8,0/ N-Lauril sarcosil 10%/ Água Milli-Q [q.s.p.]) e 5 µL de proteinase K (Sigma) - 50 mg/ µL - e incubados a 50ºC por 2 horas. Após a incubação, foi retirada a solução de lise, e foram feitas 3 lavagens acrescentando 10 mL de água Milli-Q esterilizada a 50ºC por 15 minutos e uma lavagem com 7 mL de Tampão TE a 50ºC por 15 minutos. No final desta etapa, os blocos foram armazenados em 2 mL de TE a 8 ºC .

Um pedaço correspondente a um terço do plug, foi transferido para o microtubo contendo solução tampão da enzima de restrição (*Xba*I (Promega) para *K. pneumoniae* e *Escherichia coli,* ApaI (Invitrogen) para *Acinetobacter baumannii* e SpeI (Fermentos) para *Pseudomonas aeruginosa,* 45 µL de água Milli-Q e 5 µL de solução tampão da enzima (10X - Roche) e incubado a 4ºC por 30 minutos.

Posteriormente os plugs *K. pneumoniae* e *E. coli* foram tratados com 47,0 µL de um mix (5 µL de solução tampão da enzima Multi Core-10X Buffer (Promega), 0,5 µL de BSA (Bovine Serum Albumin-Acetylated (Promega) e 41,5 µL de água Milli-Q), e 3 µL da enzima de restrição *Xba*I por 3 horas a 37ºC.

Os plugs de *A. baumannii*, foram tratados com 47,0 µL de um mix (5 µL de solução tampão da enzima Multi Core-10X Buffer (Promega), 0,5 µL de BSA (*Bovine Serum Albumin-Acetylated* (Promega) e 41,5 µL de água Milli-Q), e 3 µL da enzima de restrição. ApaI por 2 horas a 30ºC .

Os plugs de *P. aeruginosa,* foram tratados com 49,5 µL de um mix (5 µL de solução tampão da enzima *Fast Digest Green Buffer* (Fermentas), e 44,5 µL de água Milli-Q), e 0,5 µL da enzima de restrição. SpeI por 3 horas a 37ºC

Os fragmentos de restrição foram separados em gel de agarose *low melting* - SeaKem Gold Agarosea 1,1%, preparados em TBE 0,4 X . Após a solidificação do gel, este foi submetido a eletroforese de campo pulsado, utilizando o sistema CHEF-DRIII (Bio-Rad, Richmond, EUA).

Foram utilizadas as seguintes condições para a eletroforese: *K. pneumoniae* e *E. coli:* pulso crescente de 0.5 a 35 segundos, por 17 horas, *P. aeruginosa:* de 5 a 35 segundos, por 14 horas e *A. baumannii* pulso crescente de 0.5 a 15 segundos, por 18 horas, com ângulo de 120º, a 6 V/cm, na temperatura de 13ºC. Foram utilizados padrões de peso molecular *Lambda Ladder PFG Marker* (50-1000 Kb-Biolabs) nas corridas.

Após as corridas eletroforéticas, os géis foram corados com brometo de etídio durante 15 minutos e descorados em água por mais 15 minutos. Foram visualizados sob luz ultravioleta e fotografados utilizando-se a ferramenta de fotodocumentação L-pix Molecular Imaging (Loccus Biotecnologia). As análises dos géis e a confecção dos dendogramas foram realizadas com auxílio do software GelCompar II (Applied Maths, KortrijK, Belgium).

3.5. Análise dos perfis proteômicos por MALDI-TOF MS

As linhagens bacterianas selecionadas foram analisadas na Plataforma de Análise Estrutural do Centro de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, Braga, Portugal. O equipamento utilizado foi o MALDI-TOF MS Axima LNR system (Kratos Analytical, Shimadzu, Manchester, UK) equipado com laser de nitrogênio (337nm).

As linhagens bacterianas, foram subcultivadas em meio Ágar Sangue (ágar Columbia-Oxoid, com 5% sangue de carneiro), e incubadas a 37ºC por 24h. Depois de atingirem a fase exponencial de crescimento, uma pequena quantidade da amostra do material biológico, cerca de 1µg de biomassa (aproximadamente 10^7UFC por amostra), foi transferido diretamente da placa de cultivo, para a placa de MALDI-TOF. Por se tratar de bactérias patogênicas foi feito a inativação do material biológico, em capela de seguranca biológica, com solução aquosa de trifluoroacético 20%, antes de adicionar a solução matriz. Cada isolado foi feito em duplicata.

Para alguns isolados, a extração das proteínas direta na placa de MALDI-TOF MS não foi eficiente devido as características peculiares do microrganismo. Nesses casos, foi necessário recorrer-se à metodologia de extração de proteínas emmicrotubo tipo *ependorf*. Uma colônia bacteriana foi colocada no fundo de um microtubo tipo *ependorf,* com o auxílio de agulha estéril. Foi imediatamente adicionado 1.5 µL da solução saturada da matriz CHCA (α cyano 4 hydroxycinnamic acid) em 33% de etanol, 33% de acetonitrilo, 3% ácido trifluoro acético e 3% de água ultra pura, recém preparado. A colônia foi dissolvida, com ajuda do vórtex. Foi colocado 1µL desta amostra na placa de MALDI-TOF MS.

Após evaporação, à temperatura ambiente (25ºC), foi obtida uma amostra cristalizada, com características rugosas, necessária à ionização das moléculas. Estes inóculos foram transferidos para obtenção dos espectros, no equipamento de MALDI-TOF MS, que foi calibrado antes do início da análise das amostras, com células intactas de *E. Coli* DH5α, com valores de massa protéica ribossomal conhecida, sendo doze proteínas bem definidas usadas como padrão (4.365,4; 5.096,8; 5.381,4; 6.241,4; 6.255,4; 6.3162; 6.411,6; 6.856,1; 7.158,8; 7.274,5; 7.872,1; 9.742 e 12.227,3 Da).

Os espectros de massas dos biomarcadores celulares dos microrganismos, foram obtidos dentro da escala de massas compreendida entre 2.000 e 20.000 Da e foram adquiridos no modo linear com um retardamento de 104 ns e uma voltagem de aceleramento de +20 KV. Os espectros finais foram obtidos pela soma de 20 tiros de laser acumulados por espectro parcial e 50 espectros produzidos por amostra, levando a um total de 1000 tiros por espectro, como previamente descritos na literatura (Santos *et al.,* 2010; Santos e Lima, 2010a; Santos *et al.,* 2011).

3.5.6. Classificação dos microrganismos por MALDI-TOF MS

Para a classificação dos microrganismos o MALDI-TOF MS equipado com *software* e um extenso banco de dados com espectros de referências, permitiu comparações dos espectros referente a proteína desconhecida com a massa molecular de referência, que geralmente são as proteínas ribossomais, de diferentes espécies de microrganismos. Foi levado em consideração a presença ou ausência dos picos referentes às proteínas disponíveis. A intensidade dos picos (concentrações) não foi relevante no processo de identificação.

A análise da massa espectral (biomarcadores) das linhagens bacterianas foi realizada usando o *software* SARAMIS (*Spectral Archiving and Microbial Identification System*, *AnagnosTec, Postdam-Golm, Germany,* www.anagnostec.eu).

3.6. Estabelecimento da Coleção de Culturas de Bactérias de Referência do HUCAM

Com o objetivo de manter as linhagens avaliadas na presente tese viáveis e disponíveis para estudos futuros e análises de rotina, uma coleção de culturas foi criada atendendo às regulamentações nacionais e internacionais. A coleção foi nomeada como CCBR-HUCAM (Coleção de Culturas de Bactérias de Referência do HUCAM) e está sediada em sala anexa ao laboratório de microbiologia clínica do HUCAM, sendo monitorada pela curadora microbiologista responsável do laboratório.

Esta coleção também foi criada com o objetivo de fornecer linhagens bacterianas de referência bem identificadas e caracterizadas para atender a outros profissionais da UFES, como professores e alunos na demanda das atividades de ensino, programas de pesquisa, estudos de taxonomia e publicações. O objetivo futuro é a troca de informações entre outros centros de pesquisas e de ensino.

Na rotina laboratorial a CCBR-HUCAM também será utilizada em testes de controle de qualidade de produtos, materiais e processos.

3.6.1. Meio de cultura utilizado para armazenamento

Foram semeadas em Caldo BHI (*Brain Heart Infusion*- Oxoid) com 20% glicerol (v/v) em microtubos de 2mL, guardadas em caixas adequadas para estes microtubos numeradas em ordem crescente pela data de coleta do material clínico.

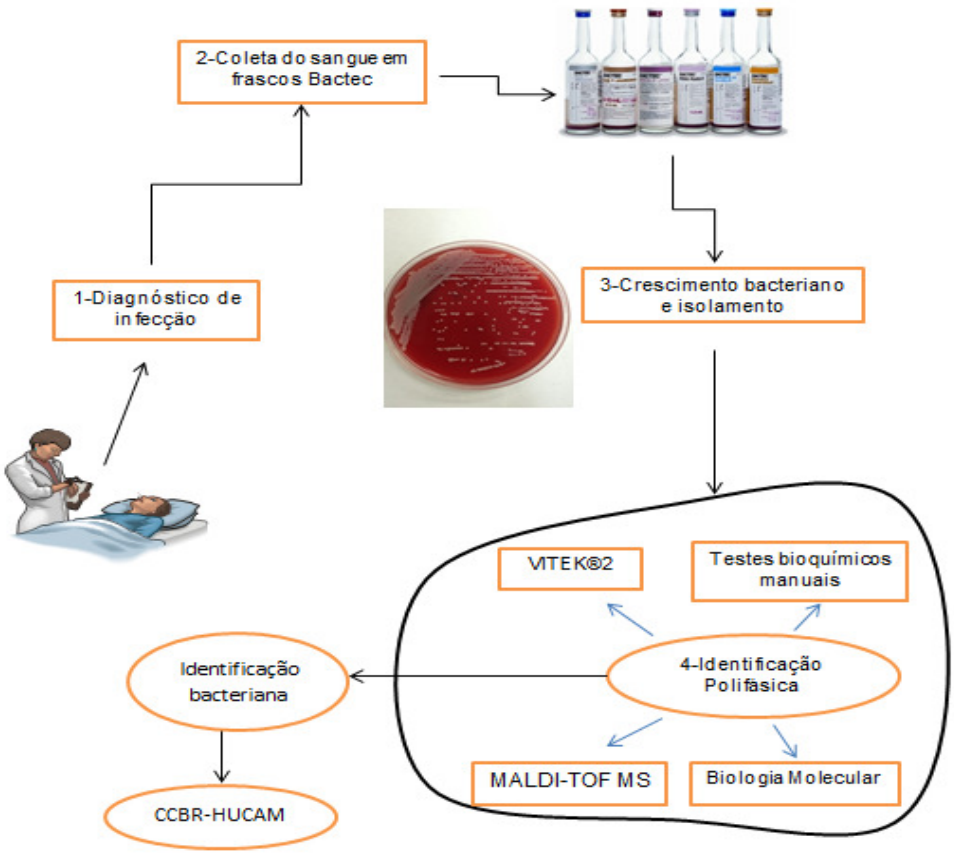
3.6.2. Método de preservação

As bactérias do presente estudo foram preservadas pelo método de congelamento a -20°C por dois anos, após este período foram repicadas em meios Ágar Sangue para avaliação da viabilidade das estirpes e semeadas em duplicata para o congelamento em freezer a -70°C, seguindo o item descrito em 3.6.1. Para evitar a perda das culturas em

caso de falta de energia, o laboratório dispõe de um gerador de emergência, para manter alguns equipamentos essenciais funcionando.

3.6.3. Cadastro e armazenamento dos dados

A gestão das linhagens bacterianas e as informações com os dados do paciente como nome, setor de internação e data de coleta do sangue, testes fenotípicos realizados para detecção dos possíveis mecanismos de resistência, genes de resistência encontrados por testes moleculares (PCR), foram cadastrados em planilha Excel, para futura consultas. A cada consulta realizada é realizada um *back-up* do acervo principal em local distinto, evitando os riscos de perda dos dados por motivos diversos. O esquema 5 mostra os passos do isolamento e identificação polifásica das linhagens bacterianas.



Esquema 5 - Passos da identificação polifásica das linhagens bacterianas realizada na criação da CCBR-HUCAM. Esquema proposto por Cledir Santos (Comunicação Pessoal).

Capítulo 4. Resultados e Discussão

4.1. Linhagens bacterianas

Durante o período de estudo, de janeiro a dezembro de 2011, a Unidade do Laboratório de Análises Clínicas, no setor microbiologia, recebeu um total de 3.214 exames para realização de hemocultura, provenientes de pacientes internados e ambulatoriais, distribuídos em diferentes setores hospitalares do HUCAM.

No presente estudo, foram analisadas e selecionadas 282 linhagens bacterianas, isoladas de infecções da corrente sanguínea de 257 pacientes, totalizando 107 Bacilos Gram-Negativos (BGN): *Klebsiella pneumoniae* (n=33, 12%), *Escherichia coli* (n=33, 12%), *Acinetobacter baumannii* (n=22, 8%), *P. aeruginosa* (n=19, 7%) e 175 de Cocos Gram-Positivos (CGP): *Staphylococcus aureus* (n=88, 30%), *Staphylococcus epidermidis* (n=56, 20%), *Enterococcus* spp (n=31, 11%) (gráfico 1).

Dos pacientes (n=257), envolvidos neste estudo, 9% tiveram infecções polimicrobianas, sendo 7% com duas hemoculturas positivas e 2% apresentaram três hemoculturas positivas, com coletas de sangue em períodos diferentes (dias). Todas estas amostras foram consideradas como infecções distintas.

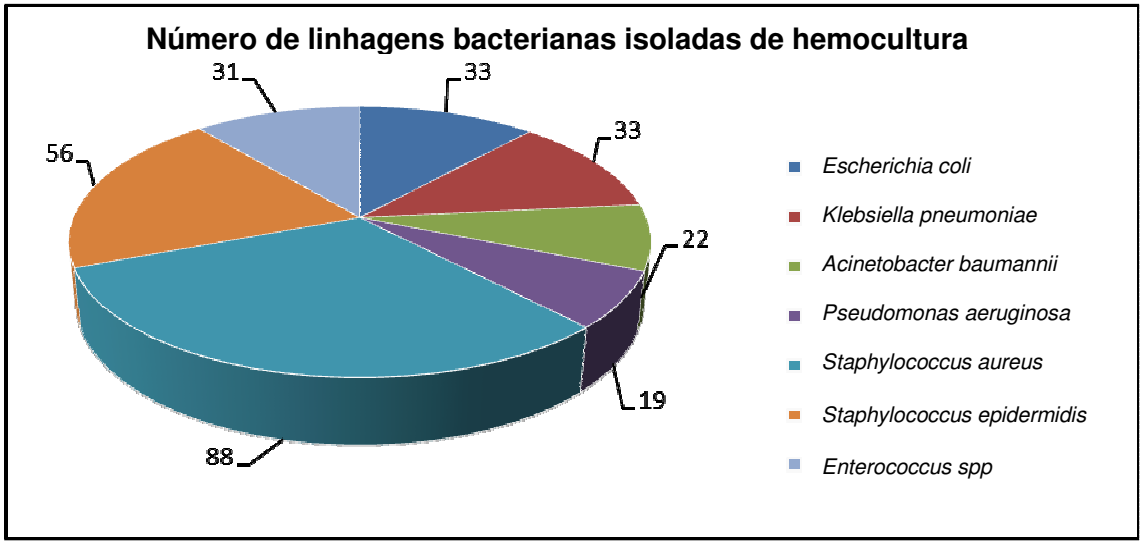


Gráfico 1 - Distribuição por espécie das 282 linhagens bacterianas isoladas de hemocultura e selecionadas neste estudo.

As linhagens bacterianas de BGN e CGP envolvidos neste estudo apresentando mecanismos de resistências relevantes estão representados no gráfico 2 e 3.

Os BGN produtores de ESBL foram recuperados em 21% de *E. coli* (7/33) e em 51% de *K. pneumoniae* (17/33). Em relação aos BGN-NF, 55% de *A. baumannii,* foram resistentes a carbapenêmicos (12/22) e 21% em *P. aeruginosa* (4/19). Em relação aos CGP, a resistência a oxacilina foi de 44% (39/88) em *S.aureus* e 57% (32/56) em *Staphylococcus epidermidis*. As linhagens de *Enterococcus* spp VRE representam 45% dos enterococos isolados no período do estudo (gráfico 2 e gráfico 3).

Os enterococos resistentes a vancomicina foram recuperados de linhagens de *E. faecium* (n=12) e *E. gallinarium* (n=2). Os *E. gallinarium,* foram isolados do mesmo paciente, com intervalo entre as coletas de uma semana, sendo considerados neste estudo, as duas linhagens para confirmação da espécie.

Legenda: ESBL= Beta lactamase de espectro estendido, R*= Resistência a carbapenêmicos.

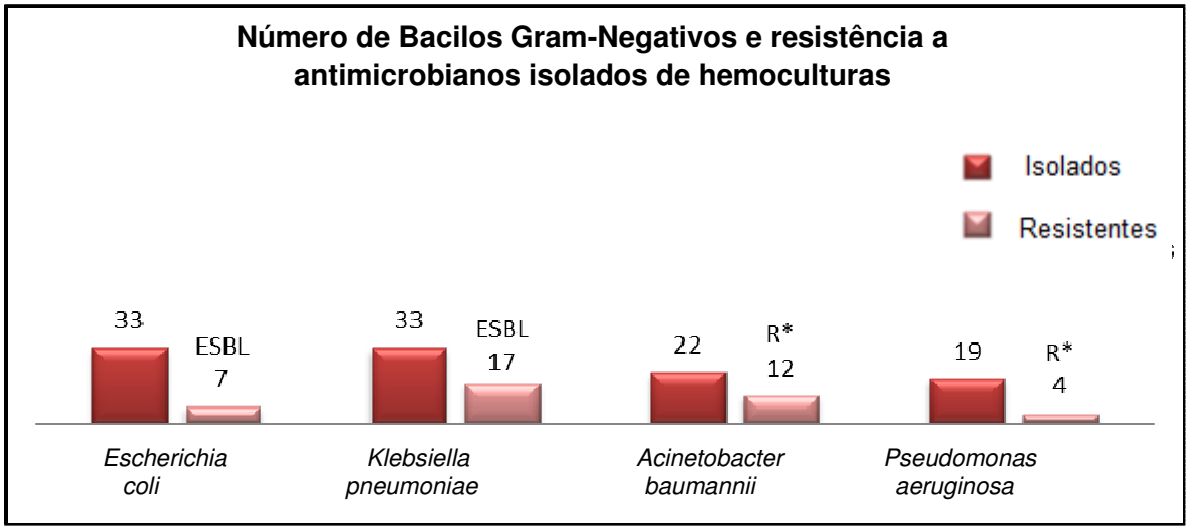


Gráfico 2 - Número total das linhagens de Bacilos Gram-Negativos selecionados neste estudo e resistência a antimicrobianos, isoladas de hemocultura.

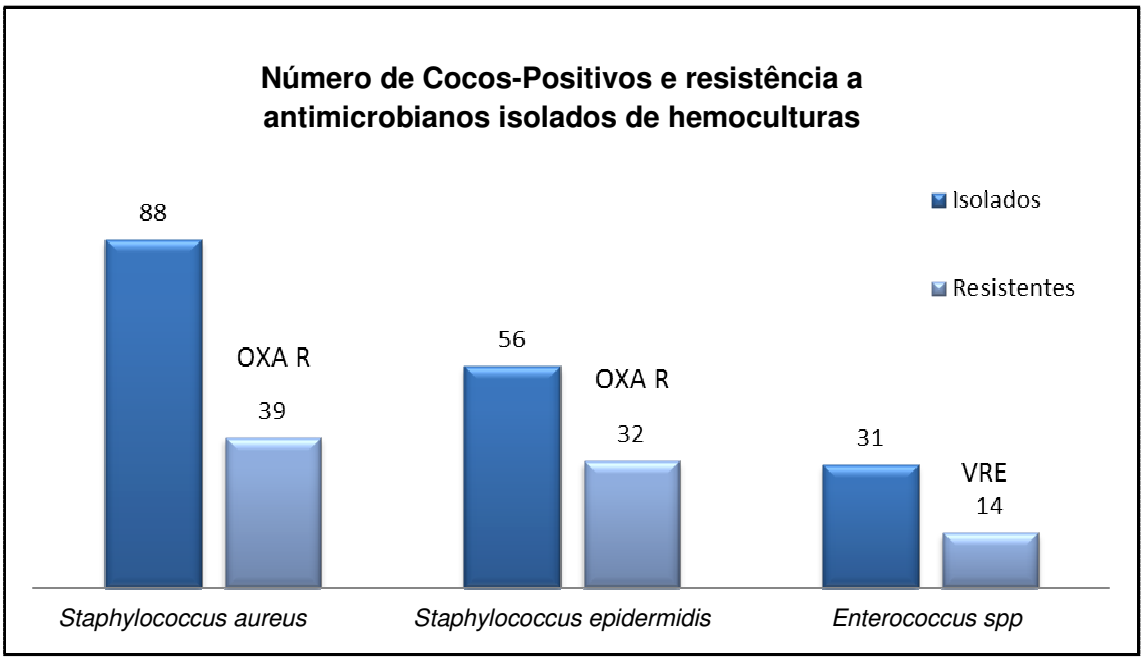


Gráfico 3 - Número total das linhagens de Cocos Gram-Positivos selecionados neste estudo e resistência a antimicrobianos, isoladas de hemocultura.

Legenda: OXA R = Resistência a oxacilina; VRE = Enterococos resitentes a vancomicina.

4.2. Setores hospitalar

As amostras analisadas no estudo foram provenientes de 12 setores hospitalares do HUCAM, nomeadamente: Cardiologia (CARDIO), Clínica Cirúrgica (CCir), Enfermaria de Clínica Médica (CM), Centro de Terapia Intensiva (CTI), Gastrologia (GASTRO), Ginecologia (GO), Hematologia (HEMATO), Nefrologia (NEFRO), Unidade de Tratamento Intensivo Neonatal (UTIN), Pronto Socorro (PS), Pediatria (PED), Pneumologia (PNEUMO) e Urologia (URO), assim como demonstrado nas tabelas 9, 10 e 11. A maioria das amostras de enterobactérias, correspondendo a 80% (53/66), foi recuperada dos setores PS, CM e CTI. O setor PS se destaca apresentando um número expressivo de isolamento destes patógenos (42%, conforme tabela 9).

Os setores hospitalares do HUCAM que apresentaram maior frequência de isolamento de bacilos Gram-Negativos não fermentadores (BGN-NF) foram o CTI (n=15, 36%) e o PS (n=11, 27%) (tabela 10).

Os Cocos Gram-Positivos foram isolados de quase todos os setores hospitalar do HUCAM, tendo sua maior prevalência no PS (64/175, 36%), seguido da CM (33/175, 19%). Não foi observado isolamento de CGP nos setores da GO e PNEUMO. Os *Enterococcus* spp. não foram isolados na PED e CARDIO (tabela 11).

Tabela 9 - Número de *E. coli e K. pneumoniae* isoladas nos setores do HUCAM.

Setores	Linhagem bacteriana		Total
	E. coli **(n=33)**	***K. pneumoniae*** **(n=33)**	
CARDIO	0	0	0
CCir	1	0	1
CM	11	2	13
CTI	3	9	12
GASTRO	0	0	0
GO	0	1	1
HEMATO	0	0	0
NEFRO	1	0	1
UTIN	2	5	7
PS	14	14	28
PED	1	1	2
PNEUMO	0	0	0
URO	0	1	1
Total	**33**	**33**	**66**

Tabela 10 - Número de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* isoladas nos setores do HUCAM.

Setores	Linhagem bacteriana		Total
	A. baumannii **(n=22)**	***P. aeruginosa*** **(n=19)**	
CARDIO	0	0	0
CCir	1	0	1
CM	6	1	7
CTI	8	7	15
GASTRO	0	0	0
GO	0	0	0
HEMATO	1	0	1
NEFRO	0	0	0
UTIN	1	3	4
PS	4	7	11
PED	1	1	2
PNEUMO	0	0	0
URO	0	0	0
Total	**22**	**19**	**41**

Tabela 11 – Número de *Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis e Enterococcus* spp. isolados nos setores do HUCAM.

Setores	Linhagem bacteriana			Total
	S. aureus **(n=88)**	***S. epidermidis*** **(n=56)**	***Enterococcus spp*** **(n=31)**	
CARDIO	2	0	0	2
CCir	12	6	1	19
CM	20	10	3	33
CTI	6	5	8	19
GASTRO	0	1	1	2
GO	0	0	0	0
HEMATO	4	0	1	5
NEFRO	9	4	2	15
UTIN	1	5	1	7
OS	31	21	12	64
PED	2	4	0	6
PNEUMO	0	0	0	0
URO	1	0	2	3
Total	**88**	**56**	**31**	**175**

Os setores hospitalares da CTI, PS e CM, são classificados como setores importantes do HUCAM, devido a complexidade dos processos e fluxo dos pacientes. Os setores que apresentaram maior frequência de isolamento de enterobactérias produtoras de ESBL (*Extended spectrum of beta-lactamase)*, para *E. coli* (n=7) se destaca o PS e CM (45% cada) e para *K. pneumoniae* (n=17), PS (50%) e CTI (40%). No CTI não houve isolamento de *E.coli* ESBL e na CM não houve *K. pneumoniae* ESBL (gráfico 4).

Em relação aos BGN-NF resistentes a carbapenêmicos, a A*. baumannii* (n=12) teve 60% de isolamento no CTI, seguida do PS e CM, com 16% cada. A *P. aeruginosa* (n=4), foram isolados no CTI e PS (50% cada) (gráfico 4).

Em relação as linhagens de *S. aureus* (n=88), 39 linhagens foram resistentes a meticilina (oxacilina), denominados MRSA. A maior prevalência de isolamento de MRSA foi no PS (12/39, 31%), seguido da CM (8/39, 20%) e CTI (5/39, 13%) (gráfico 4). A CCir apresentou 23% dos isolamentos (9/39) (não demonstrado no gráfico 4)

Os *Enterococcus faecium* resistentes a vancomicina, denominados VRE, o setor PS se destaca, representando 50% dos isolamentos, seguido do CTI com 29%. Não teve isolamento de VRE na CM (gráfico 4).

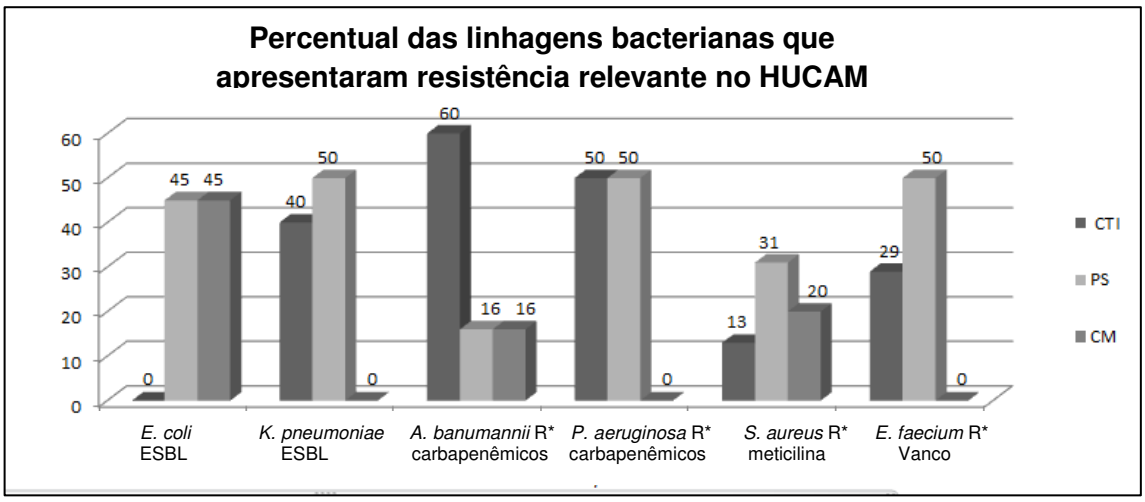


Gráfico 4 - Percentual das linhagens bacterianas que apresentaram resistência relevante (R*), em setores importantes do HUCAM.

4.3. Período de isolamento das linhagens bacterianas

Os isolamentos das linhagens bacterianas ocorreram entre os meses de janeiro e dezembro de 2011. Foi observado que as linhagens foram isoladas uniformemente durante os meses do ano, exceto no mês de abril e setembro, onde não houve isolamento das enterobactérias e enterococos. Houve um maior isolamento da maioria das espécies no mês de janeiro. Nas amostras de hemoculturas coletadas no mês de junho não houve isolamento de *S. epidermidis*, após o mês de maio ter sido o período com o maior índice no ano de isolamento deste patógeno (tabela 12).

A análise da distribuição temporal das linhagens bacterianas por trimestre mostrou que no primeiro trimestre de 2011, obtive-se um número maior de linhagens (28%), em relação aos demais trimestres. Na análise geral observou-se uma distribuição uniforme nos demais trimestres, não observando surtos (tabela 12).

Em relação ao período de isolamento, nas linhagens resistentes a classes importantes de ANTs, observou-se que *K. pneumoniae e E. coli*, produtoras de ESBL, não tiveram um período de maior isolamento ao longo do ano.

Nas linhagens bacterianas resistentes a carbapenêmicos foi observado que 75% das linhagens de *P. aeruginosa*, foram isoladas em maio e 25% em agosto, todas provenientes do CTI e PS. O mesmo não ocorreu com as linhagens de *A. baumannii,* resistentes a carbapenêmicos, que não apresentaram um período no ano onde tenha ocorrido um maior isolamento.

Tabela 12 - Período de isolamento e distribuição ao longo dos meses de 2011 das 282 linhagens bacterianas avaliadas neste estudo.

Linhagens Bacterianas	2011												Total
	jan	fev	mar	abr	mai	jun	jul	ago	set	out	nov	dez	
E. coli	9	3	6	0	1	2	0	1	2	2	4	3	33
K.pneumoniae	3	1	4	0	1	2	6	7	1	2	1	5	33
A.baumannii	1	2	3	1	2	1	4	0	2	4	1	1	22
P.aeruginosa	2	2	0	1	3	0	4	4	2	0	1	0	19
S. aureus	12	10	2	9	7	5	8	8	12	5	6	4	88
S.epidermidis	4	4	4	2	15	0	3	2	2	4	11	5	56
E. faecium	0	2	0	1	0	0	4	2	0	2	0	1	12
E. faecalis	1	2	1	1	1	3	0	2	0	1	3	2	17
E. gallinarum	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Total	34	26	20	15	30	13	29	26	21	18	27	21	**282**

4.4. Detecção fenotípica de possíveis mecanismos de resistência nos BGN

4.4.1. Detecção fenotípica de ESBL

Das 66 linhagens bacterianas de BGN-F submetidas ao teste fenotípico, 36% (24/66) apresentaram um perfil de resistência com possível produção de ESBL. Foi observada uma concordância de 100% nos testes manuais com o sistema automatizado VITEK®2. Todas as linhagens de *E.coli* foram sensíveis aos carbapenêmicos testados (imipenem, meropenem e ertapenem) (Tabela 15). Porém em duas linhagens de *K. pneumoniae* apresentaram resistência a um ou dois carbapenêmicos testados (tabela 16).

4.4.2. Teste de Hodge modificado

O teste de Hodge modificado foi realizado em duas linhagens *K. pneumoniae* designadas como Kp180 e Kp157, porque apresentaram resistência a ertapenem (tabela 16). A Kp180 foi classificada na categoria de intermediário a imipenem e meropenem pelas normas vigentes do ano. O resultado fenotípico da produção de carbapenemase tipo Kpc pelo teste de Hodge modificado foi positivo.

4.4.3. Detecção presuntiva da produção de MBLs

A detecção presuntiva da produção de MBLs foi realizada em todas as linhagens de *P. aeruginosa*, que apresentaram resistência a carbapenêmicos (n=4) e em 100 % (n=4), apresentaram teste positivo. Este teste também foi realizado em duas linhagens de *K. pneumoniae* (Kp157 e Kp161), que foram resistentes a ceftazidima e sensíveis a imipenem e meropenem. A Kp157 apresentava resistência a ertapenem, o mesmo não aconteceu com a Kp161. O teste de MBL foi realizado nestas linhagens sensíveis a imipenem e meropenem porque foi informado ao laboratório clínico, que os pacientes não apresentavam melhora clínica, com o uso de meropenem por 10 dias. O resultado fenotípico da produção de MBLs foi positivo nas duas *K. pneumoniae* com o disco de ceftazidima, usando os dois inibidores de MBLs (solução EDTA e de MPA).

4.4.4. Teste fenotípico com cefoxitina para detecção da resistência a oxacilina.

Em todas as linhagens bacterianas de *S. aureus*, foi realizada a confirmação da resistência a oxacilina, com testes manuais de disco difusão avaliando a susceptibilidade ao disco de cefoxitina de 30 ug/mL, seguindo as recomendações do CLSI 2011. Das 88 amostras analisadas, 44% (n=39) foram classificadas como MRSA e tiveram 100% de concordância com o resultado liberado pelo sistema automatizado VITEK®2.

Em todas as linhagens de *S epidermidis* (n= 56), também foi avaliado a resistência à oxacilina, como foi realizado em *S. aureus.* Obteve-se 57% de resistência (32/56), com 90% de concordância com o sistema automatizado.

4.5. Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos (TSA)

O estudo da susceptibilidade bacteriana a diferentes ANTs é importante devido à alta incidência de infecção hospitalar e altas taxas de mortalidade. Além disto, a disseminação rápida dos patógenos e o aumento da frequência de identificação de bactérias resistentes e seus genes de resistência, contribuem para que este teste seja fundamental para o clínico e a CCIH. Foi realizado o TSA em todas as linhagens bacterianas, seguindo as recomendações do CLSI 2011 e da nota técnica da ANVISA nº1/2010. Considerando os resultados intermediários como resistentes, estes também sugerem altos percentuais de resistência à maioria dos ANTs testados em relação a estes patógenos. Estes dados contribuem para o estabelecimento de critérios para a escolha do antimicrobiano adequado para o tratamento da infecção de corrente sanguínea.

Observou-se um percentual representativo de BGN-NF, não sensíveis aos carbapenêmicos testados (imipenem e meropenem): 55% em *A. baumannii* (n=12) *e* 21% em *P. aeruginosa* (n=4)**.**

Em relação a outros beta-lactâmicos, ao analisar todas as linhagens de *A. baumannii* (n=22) e *P. aeruginosa* (n=19), podem-se observar que 82% das amostras apresentaram resistência a cefotaxima para *A. baumannii* e 95 % para *P. aeruginosa.* Os ANTs ceftazidima e piperacilina/tazobactam foram resistentes em 64% das linhagens de *A. baumannii* e 10 % para *P. aeruginosa.* A cefalosporina de quarta geração cefepima foi resistente em 82% das linhagens de *A. baumannii* e 16% das *P. aeruginosa.* Analizando o monobactam, 45% foram resistentes a aztreonam em *P. aeruginosa*. Este ANT não foi testado para *A. baumannii,* porque não existem pontos de corte para interpretação do resultado de susceptibilidade, pelo CLSI (gráfico 5).

A ampicilina/sulbactam (beta-lactâmico associado a inibidor de beta-lactamases) apresentou 68% de resistência em *A. baumannii* e 95% em *P. aeruginosa* (gráfico 5). Em relação às outras classes de ANTs, foi observado um percentual elevado de resistência a fluorquinolona nas linhagens de *A. baumannii,* que foram 55% resistentes a ciprofloxacina. O mesmo não ocorrendo em *P. aeruginosa* (16%) (gráfico 5).

Os ANTs da classe dos aminoglicosídeos apresentaram um menor percentual de resistência: gentamicina (30% em *A. baumannii e* 35% em *P. aeruginosa*) e amicacina (5% em *A. baumannii* e 25% em *P. aeruginosa,*) (gráfico 5).

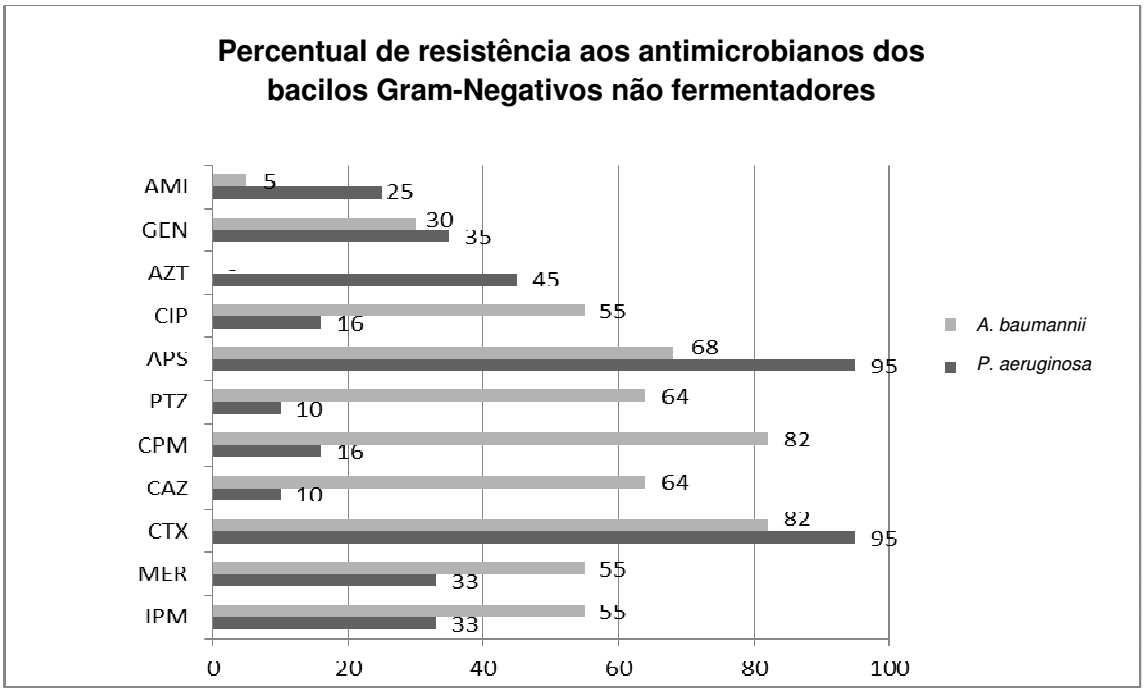


Gráfico 5 - Percentual de resistência aos antimicrobianos dos Bacilos Gram-Negativos não fermentadores.

Legenda: Antimicrobianos: AMI, amicacina; GEN, gentamicina; AZT, aztreonam; CIP, ciprofloxacina; APS, ampicilina/sulbactam; TZP, piperacilina-tazobactam; CPM, cefepime; CAZ, ceftazidima; CTX, cefotaxima; MER, meropenem; IPM, imipenem.

Quando comparamos estes dados, com as linhagens destes patógenos não sensíveis aos carbapenêmicos, este percentual aumenta: gentamicina (50% de resistência em *P. aeruginosa* e *A. baumannii*) e amicacina (50% em *P. aeruginosa,* 10% em *A. baumannii*).

A associação sulfametoxazol/trimetoprima (SXT) que é uma combinação de fármacos, o sulfametoxazol e a trimetoprima, não foi testado para estes patógenos. Para a SXT, pelo CLSI, não existem pontos de corte para interpretação do resultado de susceptibilidade em *P. aeruginosa*. Em *A. baumannii* a SXT, não é utilizada no tratamento. A tigeciclina, que é o único membro do grupo das glicilciclinas, também não foi testada. A tigeciclina não é efetiva em *P. aeruginosa* e não existem pontos de corte para interpretação do resultado de susceptibilidade, pelo CLSI para *A. baumannii*.

Aproximadamente 83% das *A. baumannii* e 50% das *P. aeruginosa* apresentaram resistência a três ou mais classes de ANTs testados, mostrando um fenótipo de resistência a múltiplas classes *in vitro,* sendo classificados como microrganismos MDR.

Foram recuperadas culturas mistas com crescimento de distintos patógenos. Em 50% das hemoculturas que apresentaram crescimento de *A. baumannii,* houve também crescimento de outras bactérias Gram-Negativas e Gram-Positivas, inclusive a presença de *E. faecium,* provenientes do CTI e PS, resistente a vancomicina em 36% dos casos. Em *P. aeruginosa*, observamos 30% de culturas mistas, originadas de diferentes setores hospitalar, com diferentes patógenos.

As linhagens de *E.coli,* foram 100% sensíveis a imipenem, meropenem, e ertapenem. *K. pneumoniae* foram 97% sensíveis a imipenem e meropenem, porém apresentou 6% de resistência a ertapenem (n=2). Estas linhagens não apresentaram fenótipo de resistência a múltiplas classes de ANTs testados *in vitro*.

Em relação as linhagens bacterianas resistentes a meticilina (oxacilina), em *S epidermidis* e *S. aureus* MRSA, a terapia de escolha seguiu os padrões internacionais, usando-se o ANT vancomicina. Contudo, observou-se que mais de 50% dos *S epidermidis* (32/56) foram resistentes a oxacilina e 44% em *S. aureus* (39/88).

Para as linhagens de VRE (n=14), observou-se que 100% dos *Enterococcus faecium* VRE (n=12), também foram resistentes aos ANTs testados rotineiramente (ampicilina; ciprofloxacina, clindamicina; eritromicina; gentamicina penicilina e teicoplanina), sendo sensíveis apenas a linezolida (100%). Não apresentaram altos níveis de resistência aos dois aminoglicosídeos conhecidas com HLAR (*High-level Resistance to Aminoglycosides*). Este fenômeno só foi observado com estreptomicina em altos níveis (93%), a gentamicina *high- level* apresentou apenas 7% de resistência (gráfico 6).

O mesmo não foi observado em *E. gallinarium*, que apresentou resistência somente a vancomicina (com níveis baixos) e clindamicina. Os outros ANTs testados foram sensíveis

(teicoplanina, ampicilina, penicilina, ciprofloxacina, eritromicina, estreptomicina *high- level*, gentamicina *high- level* e linezolida).

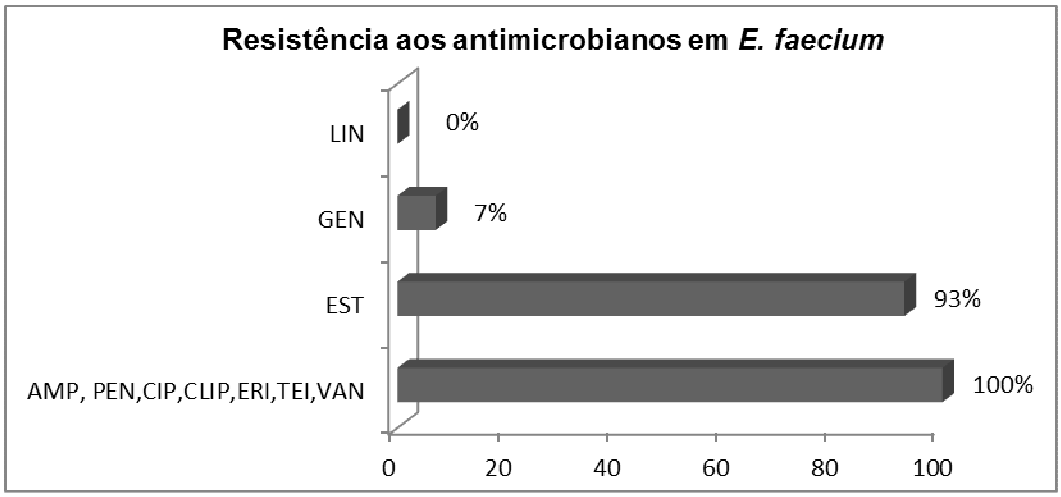


Gráfico 6 - Perfil de resistência aos antimicrobianos em 14 amostras de *E. faecium.*
Legenda: AMP, ampicilina; CIP, ciprofloxacina, CLI, clindamicina; ERI, eritromicina; EST, estreptomicina *high- level*; GEN, gentamicina *high- level*; LIN, linezolida; PEN, penicilina; TEI, teicoplanina; VAN, vancomicina.

4.6. Determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs)

A determinação das CIMs foi realizada através da fita de E-test® (AB Biodisk), para todas as linhagens bacterianas que apresentaram resistência parcial e plena aos carbapenêmicos em BGN-F e BGN-NF, resistência a vancomicina em *Enterococcus* spp e resistência não frequente a outros ANTs. Para a interpretação dos resultados usaram-se as recomendações do CLSI 2011 e da nota técnica da ANVISA 01/2010.

Antes da emissão do laudo laboratorial, para verificar a acuidade dos testes, correlacionou-se os resultados encontrados no teste E-test®, com os resultados obtidos pelo VITEK®2. Não houve diferença entre as metodologias, na classificação da categoria de susceptibilidade nas linhagens bacterianas deste estudo.

Em *A. baumannii* (n=12) e *P. aeruginosa* (n=4), resistentes a carbapenêmicos, 100% das CIMs reportadas pelo sistema VITEK®2 para os dois carbapenêmicos testados (imipenem e meropenem), foram ≥ 16µg/mL (resistente), que correspondem a última diluição do painel do VITEK®2. As CIMs determinadas pelo E-test® foram ≥ 32 µg/mL (resistente) em 100% dos casos, que correspondem a última diluição da fita. Todos ficaram na categoria de resistentes.

As CIMs nos BGN-NF, sensíveis aos carbapenêmicos, reportadas pelo sistema VITEK®2, foram baixas para *A. baumannii* (≤0.25 a 1.0 µg/mL) e em *P. aeruginosa* a CIM variou entre ≤ 0.25 a 4 µg/mL, seguindo as recomendações do ano vigente (tabela 13 e 14).

Tabela 13 - Frequência e distribuição da CIM para Imipenem e Meropenem em *Acinetobacter baumannii* sensíveis aos carbapenêmicos (n=10).

CIM VITEK®2			
Imipenem		**Meropenem**	
µg/mL	**nº/total (%)**	**µg/mL**	**nº/total (%)**
≤0.25	-	≤0.25	6/10/ (60)
≤1	10/10(100)	≤1	-
0,5	-	0,5	1/10 (10)
1.0	-	1.0	3/10 (30)

Nesta categoria de sensível, destaca-se que uma linhagem de *P. aeruginosa,* que apresentou CIM de 4 µg/mL para meropenem, e que no ano seguinte, em 2012, teve sua interpretação diferente no CLSI, passando a ser classificado na categoria de intermediário (tabela 14).

Tabela 14 - Frequência e distribuição da CMI para Imipenem e Meropenem em *Pseudomonas aeruginosa* sensíveis aos carbapenêmicos (n=15).

CIM VITEK®2			
Imipenem		**Meropenem**	
µg/mL	**nº/total (%)**	**µg/mL**	**nº/total (%)**
≤0.25	-	≤0.25	9/15 (60)
≤1	15/15 (100)	≤1	-
1.0	-	1.0	5/15 (35)
4.0	-	4.0	1/15 (5)

As linhagens de *A. baumannii* (n=22), apresentaram valores baixos de CIM para colistin: 0.5 µg/mL (70%) e 1.0 µg/mL. (30%). Porém em *P. aeruginosa* (n=19), apresentou CIM maiores: 2.0 µg/mL (85%) e 0.5 µg/mL (15%), fornecidos pelo sistema automatizado VITEK®2. Nenhum BGN-F e BGN-NF apresentaram resistência a polimixina B, com CIM variando de 0.5 a 2.0µg/mL, pelo método E-test®.

As linhagens de *E.coli* produtoras de ESBL apresentaram alta resistência a aztreonam (86%) e as cefalosporinas de terceira e quarta geração (cefotaxima, ceftazidima e cefepime). Entretanto, foram 100% sensíveis aos três carbapenêmicos testados (imipenem, meropenem e ertapenem), apresentando CIMs baixas (tabela 15).

Tabela 15 - CMI e susceptibilidade aos antimicrobianos beta-lactâmicos em *Escherichia coli*, produtoras de ESBL (n=7).

CIM VITEK®2													
Azt		**Cpm**		**Ctx**		**Caz**		**Imp**		**Mer**		**Ert**	
CIM	**Cat.**	**CIM**	**Cat.**	**CIM**	**Cat.**	**CIM**	**Cat.**	**CIM**	**Cat.**	**CIM**	**Cat**	**CIM**	**Cat**
4	R	8	R*	≤64	R	4	I*	≤1	S	≤0.25	S	0.5	S
4	R	≤64	R*	≤64	R	2	I*	≤1	S	≤0.25	S	0.5	S
≤1	S	≤64	R*	≤64	R	≤1	S*	≤1	S	≤0.25	S	0.5	S
≤64	R	16	R*	≤64	R	4	I*	≤1	S	≤0.25	S	0.5	S
8	R	4	I*	≤64	R	2	I*	≤1	S	≤0.25	S	0.5	S
≤64	R	2	I*	≤64	R	≤64	R*	≤1	S	≤0.25	S	0.5	S
16	R	8	R*	≤64	R	4	I*	≤1	S	≤0.25	S	0.5	S

Legenda: CIMs, Concentrações Inibitórias Mínimas; Azt, aztreonam; Cpm, cefepime; Ctx, cefotaxima; Caz, ceftazidima; Ipm, imipenem; Mer, meropenem; Ert, ertapenem; Cat., categoria (S= sensível; I=intermediário; R= resistente). Dados baseados na Nota técnica da ANVISA nº1/2010.

As linhagens de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL também apresentaram alta resistência ao monobactam (aztreonam) e às cefalosporinas de terceira e quarta geração (cefotaxima, ceftazidima e cefepime). Foram 94% sensíveis a imipenem e meropenem, apresentando CIMs baixas e 88% sensível a ertapenem (tabela 16).

A primeira linha da tabela 16 representa os valores das CIMs da *K. pneumoniae* (Kp180), com teste de Hodge positivo. Foi a única linhagem, com CIMs mais elevada para imipenem e meropenem (2 µg/mL). No teste E-test® apresentou CIM de 4, para ambos. Entretanto, foi classificada com a mesma interpretação em relação a susceptibilidade, classificada na categoria de intermediário, tanto pela nota técnica vigente, expedida pela ANVISA em 2010 e o CLSI 2011, em que 1.0 µg/mL é sensível e 2 a 4 µg/mL, é intermediário para imipenem e meropenem.

Na penúltima e última linha da tabela 16, podem-se observar os valores das CIMs encontrados para as duas *K. pneumoniae* (Kp157 e Kp161), que apresentaram teste para MBL positivo. As CIMs, previamente obtidas pelo VITEK®2, foram baixas para imipenem e

meropenem, entretanto foi alta para ertapenem (≥8 µg/mL) em apenas uma linhagem (Kp157). As CIMs foram reavaliadas pela metodologia E-test®, porque os sistemas automatizados podem falhar e o laboratório deve realizar provas confirmatórias em caso de dúvidas ou suspeita de falha. Houve concordância entre as categorias de interpretação dos resultados. Destaca-se que a interpretação das CIMs, para os ANTs: cefepima, ceftazidima e ertapenem seguiram a nota técnica da ANVISA nº1/2010. Todas as linhagens foram 100% sensíveis a tigeciclina (tabela 16).

Os *E. faecium* resistentes a vancomicina (VRE), obtidos inicialmente pelo sistema VITEK®2, foram confirmadas a categoria de resistentes, pelo método E-test®. Observou-se que 100% das linhagens (n=14), tiveram CIMs elevadas para vancomicina (≥256 µg/mL). Entretanto, os *E. gallinarium*, apresentaram CIMS baixas nas duas metodologias: CIM de 2 e 3 µg/mL, respectivamente.

Em todas as linhagens de *S. aureus* MRSA, também foram confirmadas as CIMs para vancomicina, pelo método E-test®, que é o ANT de escolha na terapia. As CIMs foram baixas, na maioria dos casos de 1.0 µg/mL (90%) e 1.5 µg/mL (10%).

Tabela 16 – CMIs e susceptibilidade aos antimicrobianos beta-lactâmicos em *Klebsiella pneumoniae*, produtoras de ESBL (n=17).

CIM VITEK®2													
Azt		**Cpm**		**Ctx**		**Caz**		**Imp**		**Mer**		**Ert**	
CIM	**Cat.**	**CIM**	**Cat.**	**CIM**	**Cat.**	**CIM**	**Cat.**	**CIM**	**Cat.**	**CIM**	**Cat**	**CIM**	**Cat**
32	R	≤1	S*	≤1	S	≤64	R	2	I	2	I	4	R
≤64	R	8	R*	≤64	R	≤64	R	≤1	S	≤0.25	S	0.5	S
≤64	R	32	R	≤64	R	≤64	R	≤1	S	≤0.25	S	0.5	S
≤64	R	8	R*	≤64	R	≤64	R	≤1	S	≤0.25	S	0.5	S
16	R	8	R*	≤64	R	≤64	R	≤1	S	≤0.25	S	0.5	S
2	S	4	I*	≤64	R	≤1	S	≤1	S	≤0.25	S	0.5	S
≤64	R	≤64	R	≤64	R	≤64	R	≤1	S	≤0.25	S	0.5	S
≤64	R	≤64	R	≤64	R	16	R	≤1	S	≤0.25	S	0.5	S
≤64	R	32	R	≤64	R	4	I*	≤1	S	≤0.25	S	0.5	S
≤64	R	2	I*	≤64	R	≤64	R	≤1	S	≤0.25	S	0.5	S
≤64	R	≤64	R	4	R	≤64	R	≤1	S	≤0.25	S	0.5	S
≤1	S	≤1	S	≤64	R	≤1	S	≤1	S	≤0.25	S	0.5	S
≤64	R	32	R*	≤64	R	≤64	R	≤1	S	≤0.25	S	0.5	S
4	R	2	I*	≤64	R	≤1	S	≤1	S	≤0.25	S	0.5	S
≤64	R	32	R	≤64	R	≤64	R	≤1	S	≤0.25	S	0.5	S
≤64	R	≤64	R	≤64	R	≤64	R	≤1	S	1.0	S	≥8	R
≤64	R	≤64	R	≤64	R	≤64	R	≤1	S	≤0.25	S	0.5	S

Legenda: CIMs, Concentrações Inibitórias Mínimas**;** Azt, aztreonam; Cpm, cefepime; Ctx, cefotaxima; Caz, ceftazidima; Ipm, imipenem; Mer, meropenem; Ert, ertapenem; Cat., categoria (S= sensível; I=intermediário; R= resistente); Dados baseados na Nota técnica da ANVISA nº1/2010; Destaque, vermelho= R e azul= I.

4.7. Detecção de genes de resistência por PCR

4.7.1. Detecção genotípica dos genes codificadores de ESBLs em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*

A pesquisa dos genes codificadores das beta-lactamases CTX-M, SHV e TEM foi realizada em todas as linhagens de *K. pneumoniae* e *E. coli* fenotipicamente consideradas como produtoras de ESBL. A metodologia empregada foi a reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e os produtos amplificados correspondem aos genes bla_{CTX-M}, bla_{SHV} e bla_{TEM} e especificamente a variante alélica $bla_{CTX-M-15.}$ Devido a importância mundial, as linhagens que apresentaram positividade para o gene bla_{CTX-M}, foram também submetidas a PCR, usando-se primers específicos para a variante alélica tipo $bla_{CTX-M-15}$.

Em linhagens de *K. pneumoniae*, o gene bla_{TEM} foi o mais encontrado com 53% (9/17) seguido do gene bla_{SHV} com 35% (6/17). O gene $bla_{CTX-M,}$ foi detectado em 29% (5/17) das linhagens de *K. pneumoniae*, sendo a variante $bla_{CTX-M-15}$ encontrada em 80% das linhagens com gene bla_{CTX-M} (tabela 17).

Em linhagens de *E. coli, o gene* bla_{TEM} *e* bla_{CTX-M} foram encontrados em 71% (5/7) das linhagens. A variante $bla_{CTX-M-15}$ foi encontrada em apenas uma linhagem. O gene bla_{SHV} não foi encontrado em linhagens desta espécie (tabela 17).

Quando analisamos a prevalência geral da presença destes genes, tanto em linhagens de *K. pneumoniae* e *E. coli*, o gene $bla_{TEM,}$ foi o mais encontrado com 58%. (14/24). O gene bla_{CTX-M}, foi encontrado em 42% (10/24) e o gene $bla_{SHV,}$ em 25% das linhagens pesquisadas (6/24). Nas linhagens positivas para o gene bla_{CTX-M} (n=10), a variante alélica tipo $bla_{CTX-M-15}$, esteve presente em 50% (n=5). Em 21% dos casos não obtivemos a presença de algum dos genes pesquisados (6/24) (tabela 17).

Tabela 17 - Percentual de frequência dos genes $bla_{SHV,}$ $bla_{TEM,}$ bla_{CTX-M} e a variante alélica $bla_{CTX-M-15}$ em linhagens *K. pneumoniae* e *E. coli* produtoras de ESBL.

Linhagens bacterianas	Genes				Negativas n (%)
	bla_{SHV} n (%)	bla_{TEM} n (%)	bla_{CTX-M} n (%)	Variante alélica $bla_{CTX-M-15}$ - n (%)	
K.pneumoniae (n=17)	6 (35%)	9 (53%)	5 (29%)	4 (80%)	5 (29%)
E. coli (n=7)	-	5 (71 %)	5 (71%)	1 (20%)	-
Total =24	6 (25%)	14 (58%)	10 (42%)	5 (50%)	5 (21%)

Nas tabelas 18 e 20 podemos observar o percentual de frequência dos genes codificadores de ESBLs para cada linhagem de *K. pneumoniae* e *E.coli*, avaliada por PCR.

Em cinco *K. pneumoniae* (29%), não foi encontrado nenhum destes genes pesquisados, apesar do teste fenotípico ter dado positivo para ESBL (tabela 18). O mesmo não aconteceu com *E.coli* que apresentou 100% nas suas linhagens a presença de genes pesquisados (tabela 20).

Analizando a associação de genes para cada linhagem, a Kp157 que apresentou teste MBL positivo, teve associação de dois genes (bla_{SHV} e $bla_{CTX\text{-}M\text{-}15}$). A Kp180 que deu teste Hodge positivo, só apresentou o $bla_{TEM.}$ Houve apenas uma associação de três genes (Kp186) (tabela 18).

Tabela 18 - Percentual de frequência dos genes codificadores de ESBLs em *Klebsiella pneumoniae*.

K. pneumoniae	**Genes**				**Negativas**
	***bla*$_{TEM}$**	***bla*$_{SHV}$**	***bla*$_{CTX\text{-}M}$**	***bla*$_{CTX\text{-}M15}$**	
	n (%)	**n (%)**	**n (%)**	**n (%)**	**n (%)**
Kp25	-	-	+	+	
Kp33	+	+	-	-	
Kp67	+	+	-	-	
Kp73	-	+	-	-	
Kp138	+	-	+	-	
Kp140	+	-	+	+	
Kp157	-	+	+	+	
Kp161	+	-	-	-	
Kp163	-	-	-	-	-
Kp177	-	-	-	-	-
Kp180	+	-	-	-	
Kp186	+	+	+	+	
Kp188	-	-	-	-	-
Kp223	-	-	-	-	-
Kp276	+	+	-	-	
Kp278	+	-	-	-	
Kp280	-	-	-	-	-
Total=17	9 (53%)	6 (35%)	5 (29%)	4 (23%)	5 (29%)

Legenda: "+" presença do gene e "-" ausência do gene, após reação de PCR.

Em *K. pneumoniae,* encontramos 8 perfis distintos de produção de beta-lactamases e em 41% (n=7) das linhagens em estudo, foi observado associações de genes. A associação SHV e TEM foi a mais prevalente (17%). Em cinco amostras (29%), não foi

encontrado nenhum dos genes pesquisados. Estes dados estão apresentados de forma mais resumida na tabela 19.

Tabela 19 - Percentual de associação dos genes de beta-lactamases detectados em *Klebsiella pneumoniae*, produtoras de ESBL pelo teste fenotípico (n=17).

Perfil de produção de beta-lactamases	**n (%)**
CTX-M(+),SHV(+),TEM(+)	1 (6%)
CTX-M(+),SHV(+),TEM(-)	1 (6%)
CTX-M(+),SHV(-),TEM(+)	2 (12%)
CTX-M(+),SHV(-),TEM(-)	1 (6%)
CTX-M (-),SHV(+),TEM(+)	3 (17%)
CTX-M (-),SHV(+),TEM(-)	1 (6%)
CTX-M (-),SHV(-),TEM(+)	3 (18%)
CTX-M (-),SHV(-),TEM(-)	5 (29%)

Em relação a *E.coli*, apesar de não ter sido encontrado o gene bla_{SHV} entre as linhagens fenotipicamente produtoras de ESBL (n=7), nenhuma linhagem deixou de apresentar um dos genes. Os genes mais frequentes foram os genes $bla_{CTX\text{-}M}$ e bla_{TEM} em 71% das linhagens. As linhagens positivas para o gene $bla_{CTX\text{-}M}$, também foi pesquisado a variante alélica tipo $bla_{CTX\text{-}M\text{-}15}$, presente em apenas uma amostra (n=1), conforme demostrado na tabela 20.

Tabela 20 - Percentual de frequência dos genes codificadores de ESBLs em *Escherichia coli*.

E. coli	Genes				Negativas n (%)
	bla_{TEM} n (%)	bla_{SHV} n (%)	bla_{CTX-M} n (%)	$bla_{CTX-M-15}$ n (%)	
Ec8	-	-	+	-	
Ec31	+	-	+	-	
Ec32	+	-	+	-	
Ec203	+	-	-	-	
Ec208	+	-	+	+	
Ec245	-	-	+	-	
Ec251	+	-	-	-	
Total=7	5 (71%)	0 (0%)	5 (71%)	1 (14%)	0%

Legenda: "+" representa as linhagens positivas; "-" representa as linhagens negativas, após reação de PCR.

Em *E. coli*, também foram observadas associações de genes de beta-lactamases, mas correspondendo a um único perfil (CTX-M e TEM), presente em 43% das linhagens (tabela 21).

Tabela 21 - Percentual de associação dos genes de beta- lactamases detectados em *Escherichia coli*, produtoras de ESBL, pelo teste fenotípico (n=7).

Perfil de produção de beta- lactamases	N° Amostras (%)
CTX-M(+), SHV(-), TEM(+)	3 (43%)
CTX-M(+), SHV(-), TEM(-)	2 (29%)
CTX-M (-), SHV(-), TEM(+)	2 (29%)

4.7.2. Detecção genotípica dos genes codificadores de resistência a carbapenêmicos em *Klebsiella pneumoniae*

A pesquisa destas carbapenemases do ponto de vista epidemiológico são muito importantes e precisam ser pesquisadas, principalmente a do tipo KPC e NDM, que apresentam atualmente rápida disseminação mundial. Porém, outras carbapenemases, como a OXA-48, podem estar sendo subestimadas, devido a dificuldade de detecção fenotípica e por isto foram também pesquisadas. No estudo realizado apenas uma amostra

de *K. pneumoniae* (Kp180), foi considerada positiva no teste fenotípico de Hodge para detecção de carbapenemases. Foi realizado o teste genotípico para detecção dos genes codificadores de carbapenemases, KPC, NDM e OXA-48, usando iniciadores e condições específicas das reações de PCR e apresentou resultado positivo, visualizado na coluna 6, para o gene bla_{KPC} (figura 7).

A pesquisa da produção das enzimas carbapenemases, também foi realizada em duas linhagens de *K. pneumoniae* (Kp157 e Kp161), apesar de terem sido classificadas como sensíveis a imipenem e meropenen. Somente a Kp157 apresentou-se resistente a ertapenem. O teste genotípico para a pesquisa da produção das enzimas KPC e NDM foi negativo (coluna 4 e 5 da figura 7). Foi também realizado a pesquisa de outras enzimas carbapenemases, como a IMP-1, IPM-2, IMP-4, VIM-1, VIM-2 e OXA-48. O resultado foi positivo para VIM-1 na linhagem Kp157. Não foi detectado nenhum destes genes pesquisados na Kp161.

A pesquisa da enzima SPM-1 não foi realizada por ter sido detectada até o momento, somente em linhagens de *P. aeruginosa*.

A detecção genotípica dos genes codificadores de resistência a carbapenêmicos não foi realizada em *E. coli,* porque todas as linhagens foram sensíveis a carbapenêmicos.

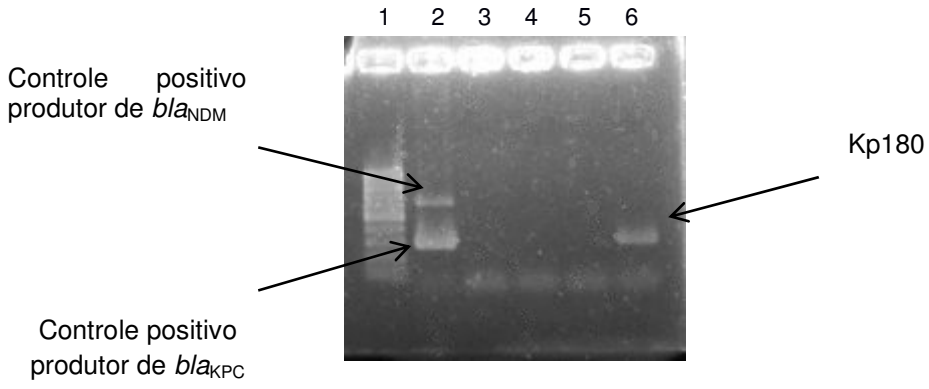


Figura 7 - Gel representativo da detecção enzima carbapenemase do tipo KPC e NDM, após PCR tipo Multiplex, em *K. pneumoniae*.

Legenda: Coluna 1, marcador de peso molecular; Coluna 2, Controle positivo produtor de $bla_{KPC,}$ ebla_{NDM}; Coluna 3, Controle negativo; Coluna 4, *K. pneumoniae* Kp157; Coluna 5, *K. pneumoniae* Kp161; Coluna 6, *K. pneumoniae* Kp180.

4.7.3. Detecção genotípica dos genes codificadores de resistência a carbapenêmicos em *Pseudomonas aeruginosa*

Em *P. aeruginosa*, nas linhagens positivas para MBLs pelo teste presuntivo fenotípico, que apresentavam resistência a carbapenêmicos (n=4), foi realizada a técnica de

PCR utilizando-se iniciadores para a detecção dos genes *bla*$_{SPM-1}$, *bla* $_{IMP}$, *bla* $_{VIM1}$, *bla* $_{VIM2}$, *bla*$_{KPC}$ e *bla*$_{NDM}$. A reação de PCR foi do tipo Multipex, para os dois grupos de carbapenemases: genes *bla*$_{KPC}$ e*bla*$_{NDM.}$ Não houve amplificação dos genes pesquisados.

4.7.4. Detecção genotípica dos genes de resistência codificadores de Oxacilinases em *Acinetobacter baumannii*

Em relação a *A. baumannii* resistentes a carbapenêmicos (n=12), foi realizada a reação PCR do tipo Multipex, dos genes codificadores de oxalicinases: *bla*$_{OXA-23}$, *bla*$_{OXA-24}$, *bla*$_{OXA-51}$, *bla*$_{OXA-58}$, *bla*$_{OXA-143}$, que são os mais frequentemente descritos nesse gênero, envolvidos na resistência a carbapenêmicos.

O OXA-51 (*bla*$_{OXA-51}$) é intrínseco desta espécie. Os isolados de *A. baumannii*, da figura 8, deram positivas somente para *bla*$_{OXA-23}$ e *bla*$_{OXA-51.}$

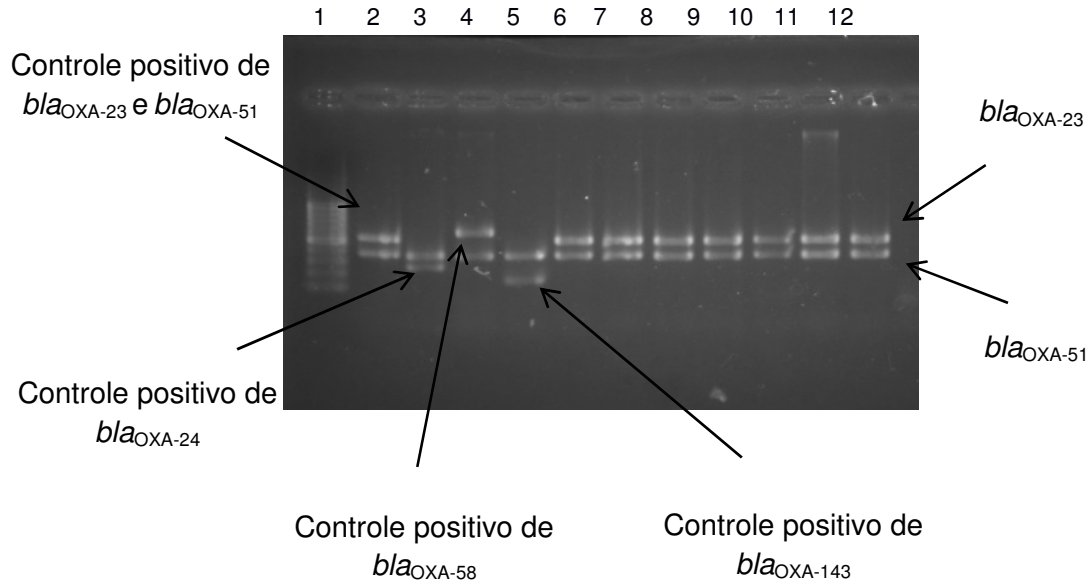


Figura 8 - Gel representativo da detecção das enzimas oxalicinases após PCR, em *Acinetobacter baumannii.*

Legenda: Coluna 1, marcador de peso molecular; Coluna 2, Controle positivo produtor de *bla*$_{OXA-23}$ e *bla*$_{OXA-51}$; Coluna 3, Controle positivo produtor de *bla*$_{OXA-24}$; Coluna 4, Controle positivo produtor de *bla*$_{OXA-58}$; Coluna 5, Controle positivo produtor de *bla*$_{OXA-143}$; Colunas 6 a 12, linhagens de *A. baumannii.*

Na figura 9, podemos observar que a maioria das linhagens de *A. baumannii*, 92% (11/12) apresentaram o gene *bla*$_{OXA-23.}$ Em apenas uma linhagem (8%) teve a presença do gene *bla*$_{OXA-58}$ (Coluna 7). Em uma linhagem representada na coluna 10, também não foi detectado o gene *bla*$_{OXA-51,}$ que é característico de *A. baumannii*, sendo provavelmente uma linhagem do complexo *A. baumannii-calcoaceticus*, incluindo outras espécies. A linhagem

da coluna 14 ficou duvidosa para o *bla*$_{OXA-51}$ e foi posteriormente confirmada dando positiva para este gene. Não foi observado a presença dos demais genes pesquisados. O controle positivo da OXA24 (coluna 4), não funcionou no gel representativo da figura 9 e foi repetido o teste para este gene. (figura 9).

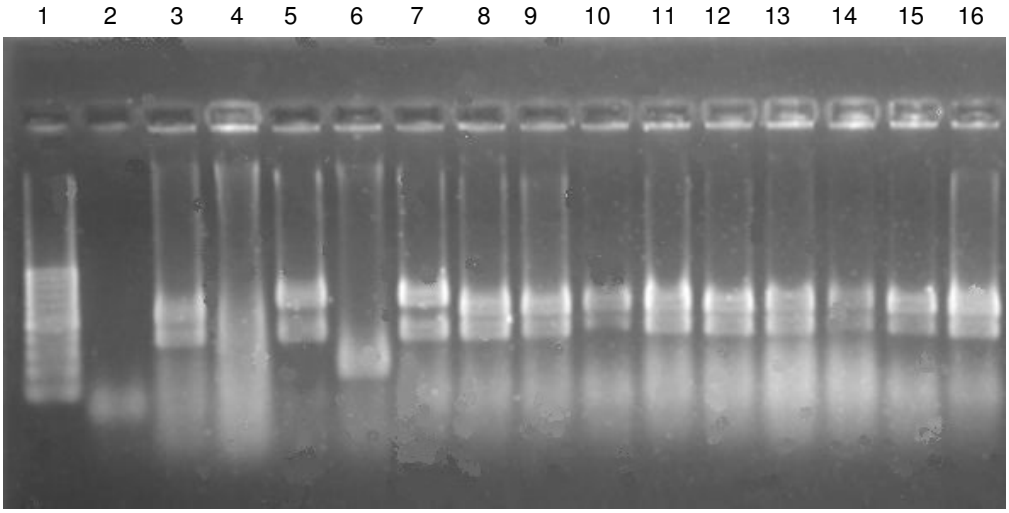


Figura 9 - Gel representativo da detecção das enzimas oxalicinases após PCR, em *Acinetobacter baumannii*.

Legenda: Coluna 1, Marcador de peso molecular; Coluna 2, Controle negativo; Coluna 3, Controle positivo produtor de *bla*$_{OXA-23}$ e *bla*$_{OXA-51}$; Coluna 4, Controle positivo produtor de *bla*$_{OXA-24}$; Coluna 5, Controle positivo produtor de *bla*$_{OXA-58}$; Coluna 6, Controle positivo produtor de *bla*$_{OXA-143}$; Colunas 7 a 16 linhagens de *A. baumannii.*

4.7.5. Detecção genotípica dos gene codificador de resistência a oxacilina em *Staphylococcus aureus*

Em relação aos CGP a detecção do gene *mecA,* por métodos moleculares é considerada padrão ouro para avaliação da resistência qualitativa a oxacilina em *Staphylococcus* spp. As 39 linhagens em estudo de *S. aureus,* resistentes a oxacilina pelo teste fenotípico de disco difusão a partir do disco de cefoxitina, 90% (n=35) apresentaram amplificação para o gene *mecA* por PCR. Na coluna 8, podemos observar *S. aureus* resistente a oxacilina, que não é produtor do gene *mecA.* Provavelmente, estas quatro linhagens que deram teste genotípico negativo para o gene *mecA,* são resistentes a oxacilina, por outros mecanismos de resistência (figura 10).

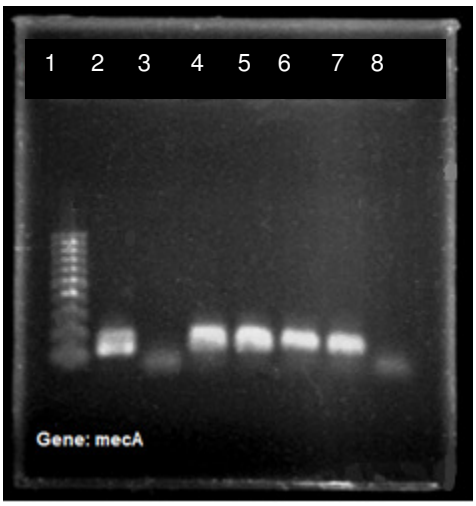


Figura 10 - Gel representativo dos amplicons do gene *mecA* nas linhagens de MRSA
Legenda: Coluna 1, marcador de peso molecular; Coluna 2, Controle positivo da reação produtor de *vanA;* Coluna 3, Controle negativo; Coluna 4 a Coluna 8, algumas das linhagens de *S. aureus* deste estudo.

4.7.6. Detecção genotípica dos genes de resistência a vancomicina em cocos Gram-Positivos

Nas linhagens de CGP pertencentes ao gênero *Enterococcus* spp. (n=31), tivemos linhagens de *E. faecium* resistentes a vancomicina (n=12) e *E. gallinarium* (n= 2) que é intrinsicamente resistente a vancomicina. Foi realizado a pesquisa por PCR dos genes *vanA,vanB e vanC* para estes enterococos (n=14). O resultado foi 100% positivo para o gene *vanA* nas linhagens de *E. faecium*. Os dois representante de *E. gallinarium* apresentaram resultado positivo para o gene *vanC*, confirmando sua identificação e apresentaram resultado negativo para os genes *vanA* e *vanB.*

4.8. Determinação do polimorfismo genético por PFGE

O PFGE é reconhecidamente uma importante ferramenta para análise de genomas bacterianos e para o estudo da diversidade entre cepas de uma mesma espécie. Para a análise da clonalidade das linhagens bacterianas, foram incluídas 100% os BGN-F e BGN-NF, representados por 100% de *K. pneumoniae e E. coli* produtoras de ESBL, *A. baumannii e P. aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos, acrescido com 50% de cada uma das linhagens descritas, selecionadas aleatóriamente, consideradas sensíveis aos principais ANTs usados na terapia. O ensaio PFGE para estas linhagens gerou perfis nítidos, que permitiu realizar análises de possíveis similaridades genéticas.

No gel representativo da tipagem molecular podemos observar que houve grande diversidade genética entre as linhagens, exceto em *A. baumannii* representada na coluna

12 (176) e coluna 13 (209), que correspondem a mesma linhagem, apresentando semelhança de bandas (figura 11).

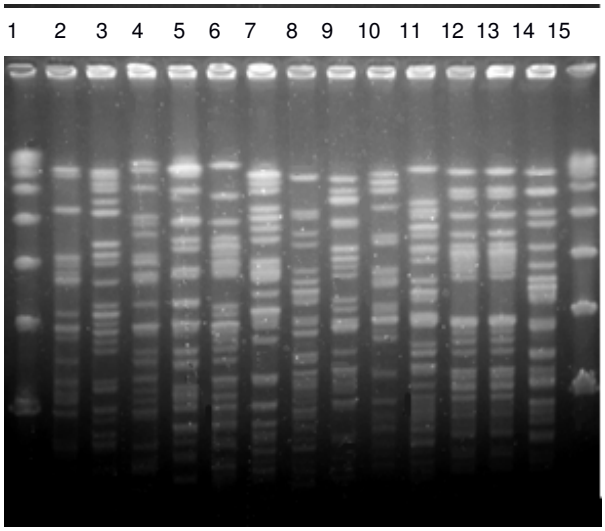


Figura 11 - Gel representativo da tipagem molecular por PFGE, em linhagens de *Acinetobacter baumannii* resistentes e sensíveis a carbapenêmicos.
Legenda: Coluna 1, marcador de peso molecular; Coluna 2 a coluna 14, linhagens em estudo de *A. baumannii* ; Coluna 15, marcador de peso molecular.

Consideram-se pertencentes ao mesmo grupo clonal amostras com no mínimo 80% de similaridade, com auxílio do software *GelCompar II* (versão 1.5), utilizando o coeficiente de Dice.

Em *A. baumannii* (n=19), foi observado um total de 18 grupos clonais, não havendo nenhum perfil prevalente. O grupo clonal (209 e 176) foi encontrado em duas linhagens isoladas em diferentes setores (figura 12).

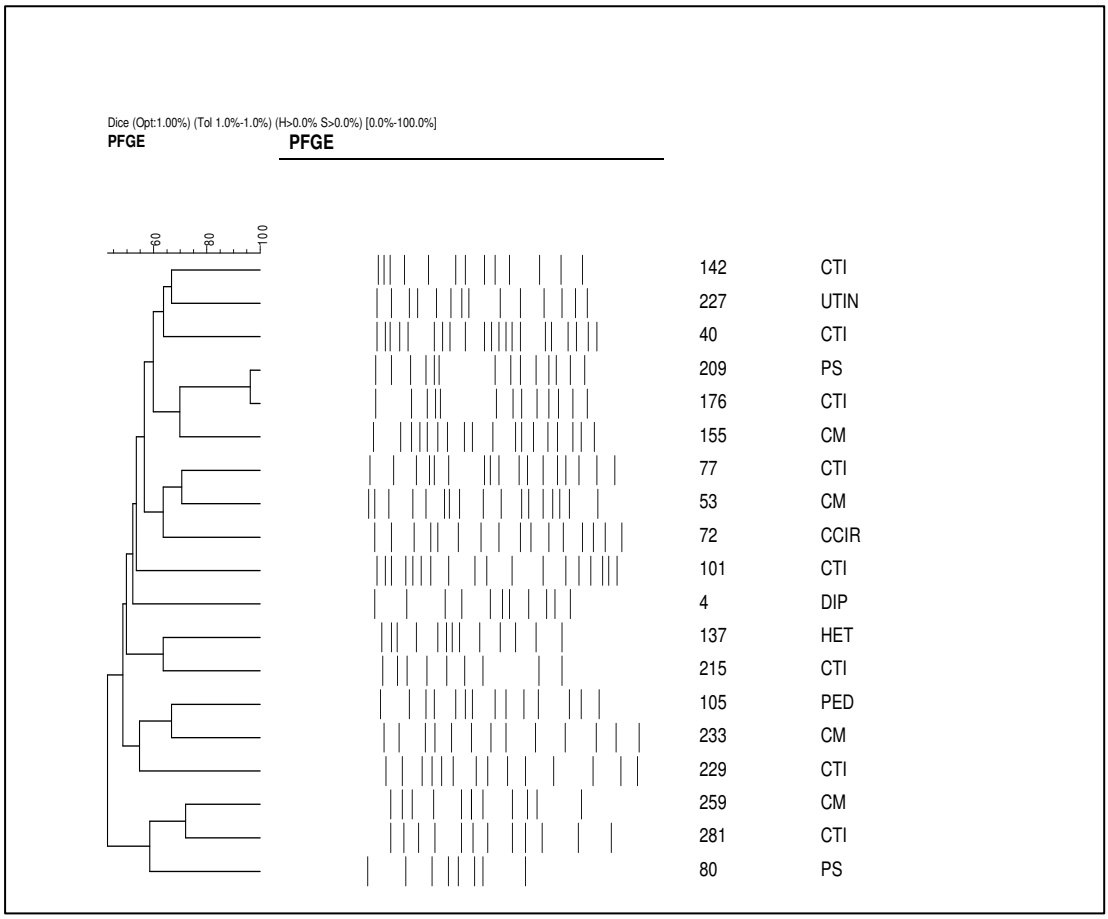


Figura 12 - Dendrograma dos perfis de fragmentação de DNA cromossomal encontrados em *Acinetobacter baumannii* (n=19), obtidos pela eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE).

Para *A. baumannii* resistentes a carbapenêmicos (n=12), foi observado um total de 11 grupos clonais, não havendo nenhum perfil prevalente (figura 13). As linhagens bacterianas representadas pelo número 176 e 209, são estreitamente relacionadas, apresentando acima de 96% de similaridade, recuperadas em julho e setembro de pacientes provenientes de diferentes setores CTI e PS, respectivamente. Este dado indica que houve transmissão desta linhagem bacteriana, entre estes setores do HUCAM (figura 13 e 14).

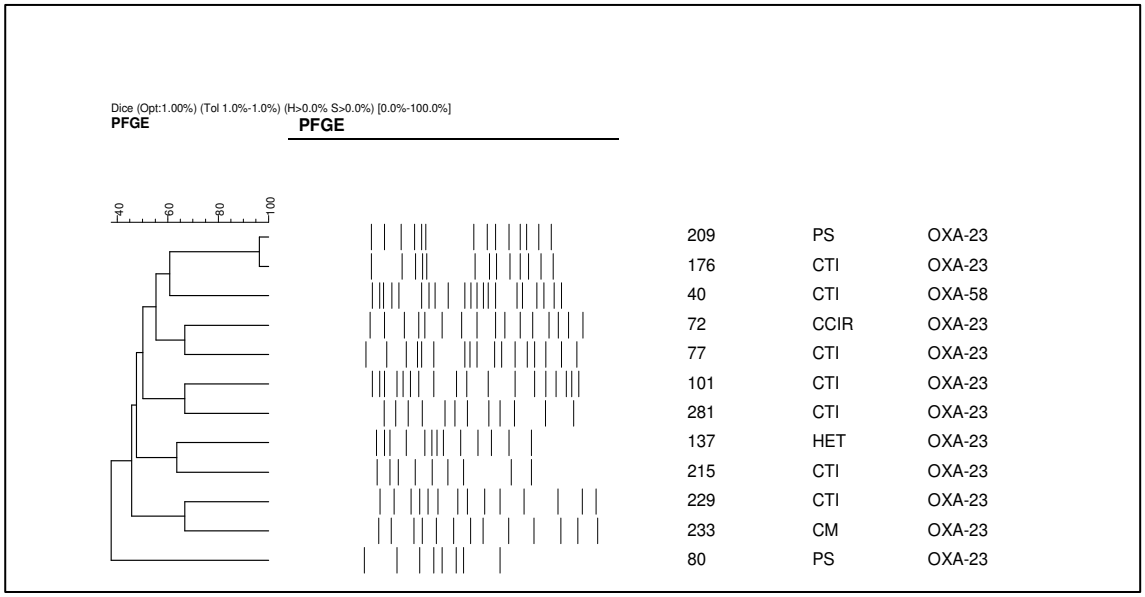


Figura 13 - Dendrograma dos perfis de fragmentação de DNA cromossomal encontrados nas 12 linhagens de *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenêmicos, obtidos pela eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE).

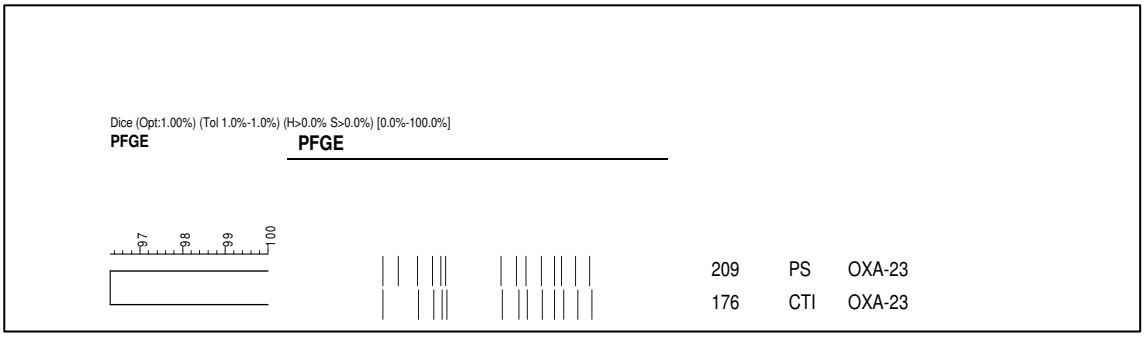


Figura 14 - Dendrograma dos perfis de fragmentação de DNA cromossomal encontrados nas 2 linhagens de *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenêmicos, obtidos pela eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE).

Entre *K. pneumoniae*, assim como nos isolados de *A. baumannii*, foi observado um alto grau de polimorfismo genético entre as linhagens bacterianas estudadas. A análise permitiu identificar um total de 21 perfis em *K. pneumoniae*, apresentando 5 grupos clonais caracterizados com similaridade mínima de 80%. Em 3 grupos clonais, não foi detectado produção de ESBLs (Kp190 e kp207; Kp62 e Kp63; Kp62, Kp63 e Kp60). Em dois grupos clonais (Kp280 e Kp276; Kp140 e Kp163), foi detectado os genes codificadores de ESBLs em associação: em Kp276 (bla_{TEM} ebla_{SHV}) e Kp140 (bla_{TEM} e$bla_{CTX\text{-}M\text{-}15}$). A Kp280 e Kp163 só apresentaram teste fenotípico positivo (figura 15).

Entre os perfis gerados no dendograma, apenas dois grupos clonais em *K. pneumoniae*, que não eram produtoras das enzimas pesquisadas de ESBL, foram

caracterizados com similaridade acima de 90% (Kp190 e Kp207; Kp62 e Kp63), circulando em diferentes setores do HUCAM , como o PS, CTI e UTIN (figura 15).

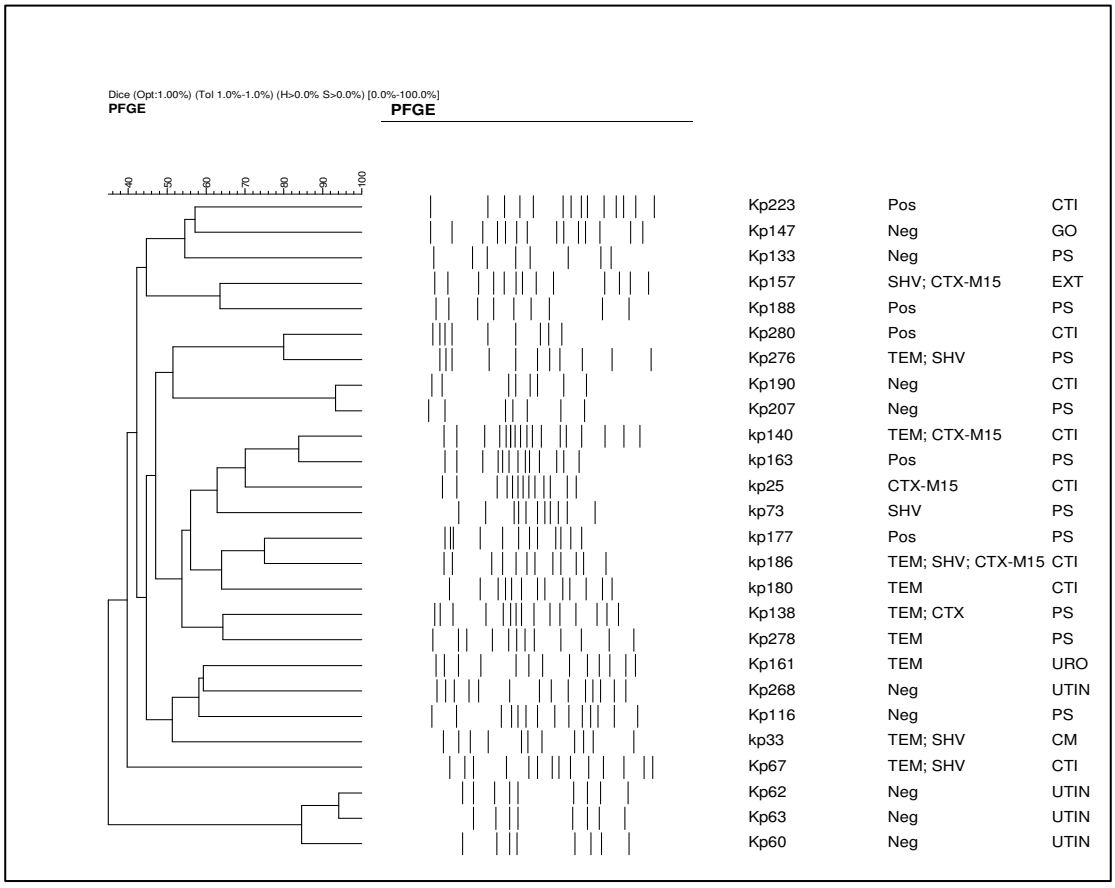


Figura 15 - Dendrograma dos perfis de fragmentação de DNA cromossomal encontrados em *K. pneumoniae* (n=26), obtidos pela eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE).

Legenda: Kp, linhagens de *K. pneumoniae* em estudo; Pos, Teste fenotípico positivo para ESBL e sem os genes codificadores de ESBLs pesquisados como o $bla_{\text{CTX-M}}$, $bla_{\text{CTX-M-15}}$, bla_{SHV} e bla_{TEM}; Neg, Teste fenotípico negativo para ESBL e sem os genes codificadores de ESBLs pesquisados; TEM, SHV, CTX, CTX-M-15, representa os genes codificadores de ESBLs pesquisados: $bla_{\text{TEM}}bla_{\text{SHV}}$, $bla_{\text{CTX-M}}$ e $bla_{\text{CTX-M-15}}$; CTI, GO, PS , EXT (corresponde ao setor PS), URO, UTIN, CM, correspondem aos setores do HUCAM.

De todas as linhagens estudadas, em cinco (Kp223, Kp188, Kp280, Kp163 e Kp177), tiveram testes fenotípico positivos para ESBL e não foi detectado a presença dos genes pesquisados, apresentando distintos perfis (figura 15). Analizando somente as *K. pneumoniae* ESBL positiva, observamos que em algumas linhagens só tivemos testes

fenotípicos positivos, nem sempre foi detectado a presença dos genes pesquisados por reação de PCR (figura 16).

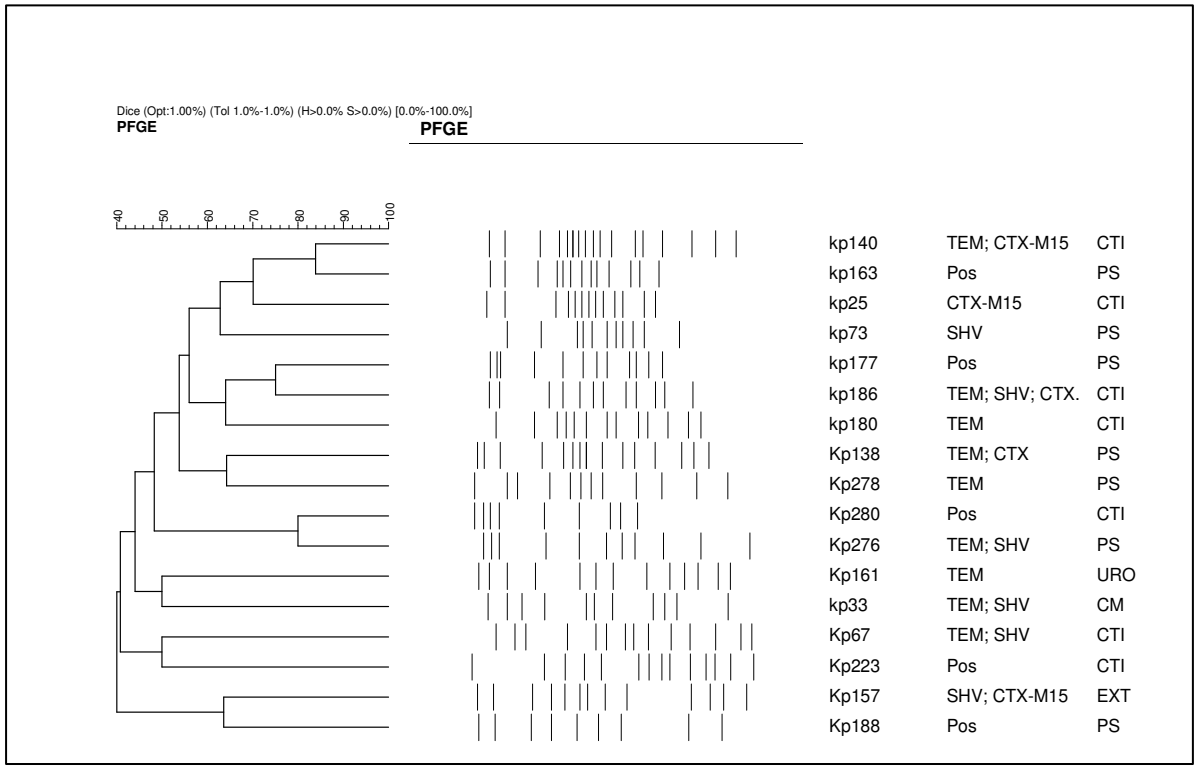


Figura 16 - Dendrograma dos perfis de fragmentação de DNA cromossomal encontrados em *K. pneumoniae* (n=17), produtoras de ESBL, obtidos pela eletroforese e em gel de campo pulsado (PFGE).

Legenda: Kp, linhagens de *K. pneumoniae* em estudo, Pos, Teste fenotípico positivo para ESBL, mas sem os genes codificadores de ESBLs pesquisados como o $bla_{\text{CTX-M}}$, $bla_{\text{CTX-M-15}}$, bla_{SHV} e bla_{TEM}; Neg, Teste fenotípico negativo para ESBL e sem os genes codificadores de ESBLs pesquisados; TEM, SHV, CTX, CTX-M-15, representam os genes codificadores de ESBLs pesquisados: $bla_{\text{TEM}}bla_{\text{SHV}}$, $bla_{\text{CTX-M}}$ e $bla_{\text{CTX-M-15}}$; CTI, PS, EXT (corresponde ao setor PS) URO, CM, correspondem aos setores do HUCAM.

Somente duas *K. pneumoniae* ESBL positiva (KP280 e Kp276), a similaridade genética foi de 80%, porém a Kp276 teve associação dos genes bla_{TEM} e bla_{SHV}, enquanto que em Kp280 não foi detectado os genes pesquisados, concluindo que não se caracterizam um clone, sendo consideradas não correlacionadas (figura 16).

Apenas um grupo clonal foi identificado em *K. pneumoniae* ESBL positiva (Kp140 e Kp163), caracterizados com similaridade mínima acima de 80%, entretanto foi detectado os genes codificadores de ESBLs pesquisados em apenas uma, podendo ser consideradas como possivelmente relacionadas (figura 16).

A *K. pneumoniae* ESBL positiva (Kp186), apresentou associação dos 3 genes pesquisados (*bla*$_{CTX-M,}$ *bla*$_{SHV}$ e *bla*$_{TEM}$) e não pertencia a um clone. Podemos concluir que houve grande diversidade genética e não houve transmissão entre pacientes do HUCAM (figura 16).

Em relação as *K. pneumoniae* produtoras de ESBL, é interessante observar que os genótipos produtores das enzimas CTX-M com a variante alélica CTX-M-15 (Kp25, Kp140 e Kp157), estão agrupados em dois grupos clonais distintos, com grau de similaridade genética menor de 80%, não estando portanto correlacionadas genéticamente (figura 17).



Figura 17 – Dendrograma dos perfis de fragmentação de DNA cromossomal encontrados em *K. pneumoniae* (n=3), produtoras das enzimas CTX-M-15, obtidos pela eletroforese e em gel de campo pulsado (PFGE).

Legenda: Kp, linhagens de *K. pneumoniae* em estudo; CTX-M15, TEM, SHV, representam os genes codificadores de ESBLs pesquisados:*bla*$_{CTX-M-15}$;*bla*$_{TEM}$ e *bla*$_{SHV}$.; CTI, EXT (corresponde ao setor PS), correspondem aos setores do HUCAM.

Em relação às linhagens de *E. coli,* foi também observado um alto grau de polimorfismo genético. A análise permitiu identificar um total de 10 grupos clonais, não havendo nenhum perfil prevalente (figura 18 e 21).

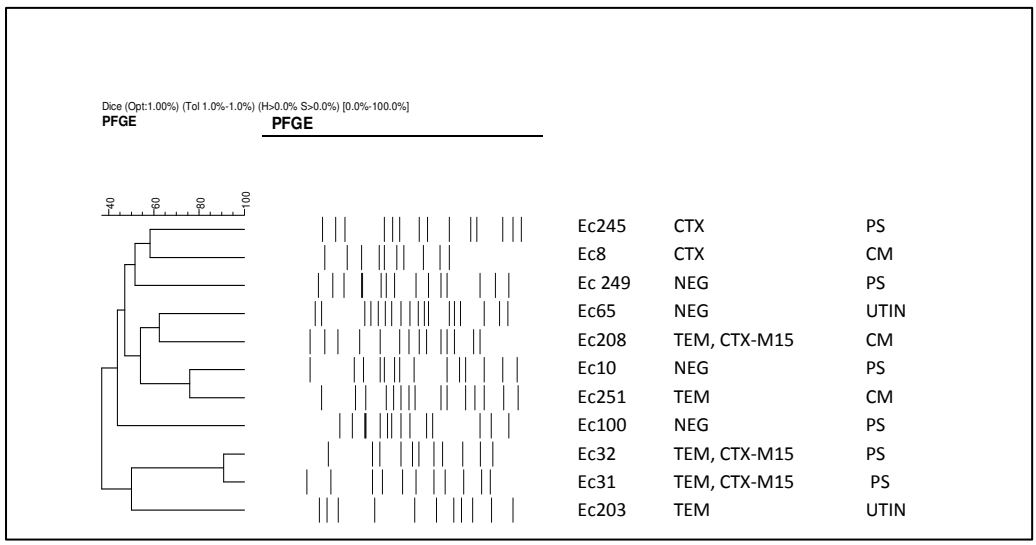


Figura 18 - Dendrograma dos perfis de fragmentação de DNA cromossomal encontrados em *E. coli* (n=11), obtidos pela eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE).

As duas linhagens de *E coli* (EC31 e EC32), foram caracterizadas com similaridade acima de 90%, sendo consideradas muito relacionadas, sendo um grupo clonal. No gel representativo da tipagem molecular por PFGE, podemos observar visualmente a semelhança entre as bandas (figura 19). Apresentam produção de beta-lactamases similares (produtoras das enzima TEM e CTX-M-15), porém foram isoladas do mesmo paciente, com coletas em dias diferentes, não significando portanto transmissão (figura 20).

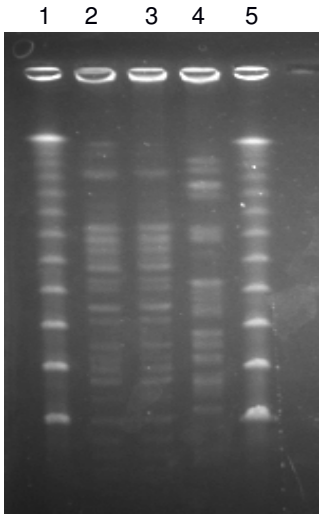


Figura 19 - Gel representativo da tipagem molecular por PFGE, em *E. coli* (EC31,EC3 e EC203).

Legenda: Coluna 1, Marcador de peso molecular, Coluna 2, EC31; Coluna 3, EC32; Coluna 4, EC203; Coluna 5, Marcador de peso molecular.

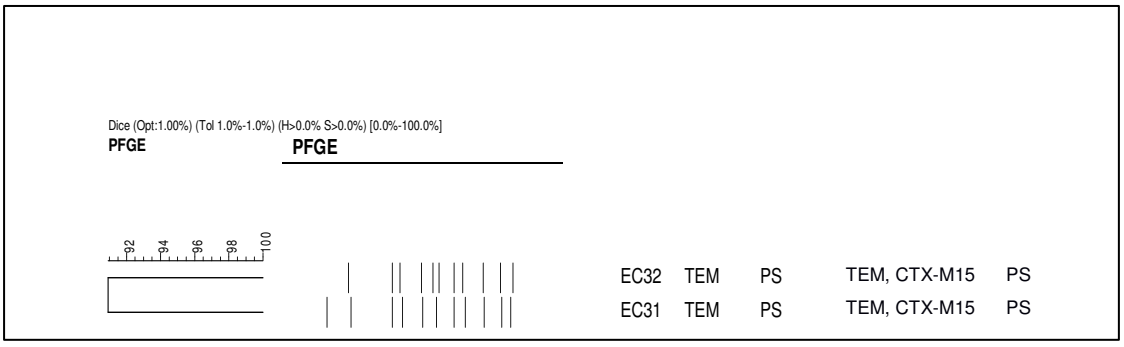


Figura 20 - Dendrograma dos perfis de fragmentação de DNA cromossomal encontrados em *E. coli* produtoras de ESBL, obtidos pela eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE).

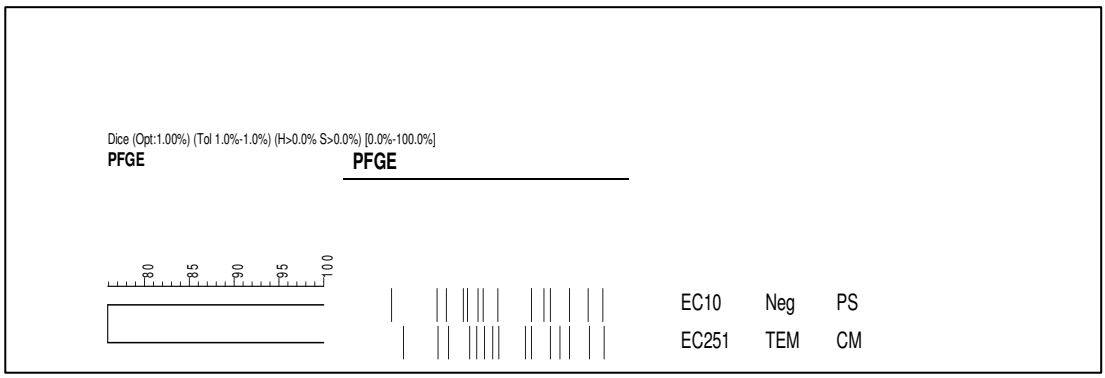


Figura 21 - Dendrograma dos perfis de fragmentação de DNA cromossomal encontrado em linhagens de *E. coli*, obtidos pela eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE).

Avaliando o polimorfismo genético em *P. aeruginosa* (n=4) resistentes aos carbapenêmicos (Ps122, Ps123, Ps179 e Ps214), verificamos 4 perfis distintos de fragmentação do DNA cromossômico, distribuídos em 4 grupos clonais que apresentaram sete ou mais bandas de diferença entre si não estão correlacionadas (figura 22).

O mesmo ocorreu com as linhagens sensiveis a carbapenêmicos (Ps204 e Ps9). O percentual de similaridade mais elevado de (79%), foi encontrado entre as linhagens Ps9 e Ps179. Portanto, nas linhagens de *P. aeruginosa* (n=6), observou-se grande diversidade clonal, tanto nas linhagens sensíveis ou resistentes a carbapenêmicos, não havendo nenhum grupo clonal prevalente. Os perfis de fragmentação do DNA de amostras representativas de cada grupo clonal estão apresentados na figura 22.

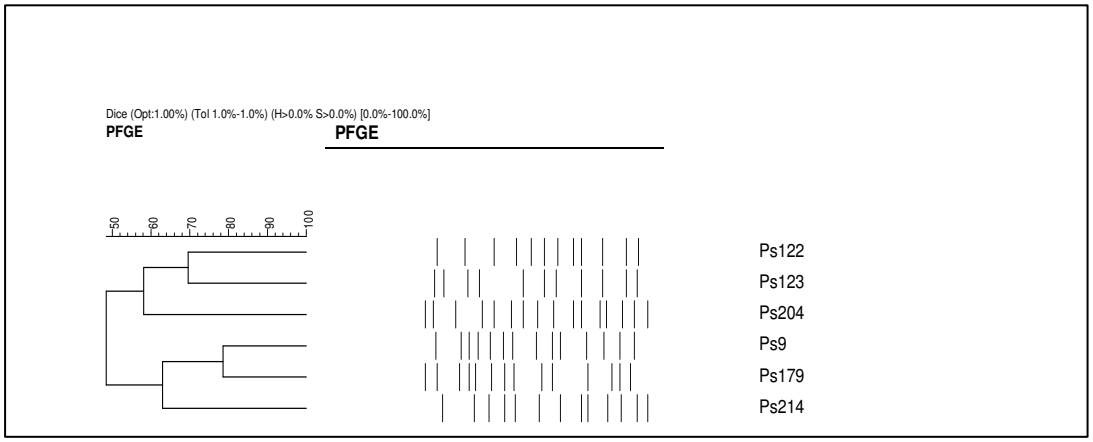


Figura 22 - Dendrograma dos perfis de fragmentação de DNA cromossomal encontrados em *P. aeruginosa* (n=6), obtidos pela eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE).

Curiosamente a *P. aeruginosa,* Ps122 e Ps123, pertence a um mesmo paciente, com coletas de sangue em dias diferentes. Observou-se que elas não fazem parte do mesmo grupo clonal conforme figura 23, apresentando similaridade de 70%, não estando correlacionadas, podendo representar contaminação de coleta, colonização e/ou infecção.

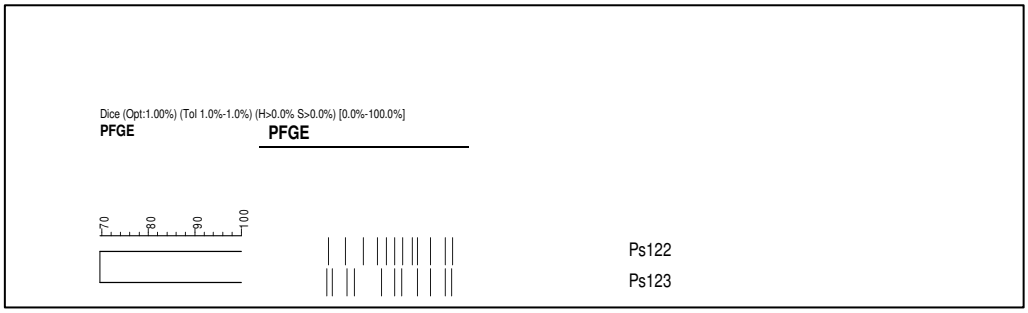


Figura 23 - Dendrograma dos perfis de fragmentação de DNA cromossomal encontrados em *P. aeruginosa* (n=2), obtidos pela eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE).

Atualmente este grupo de BGN, vem sendo isolados frequentemente recuperados de infecções consideradas graves, como as de ICS apresentando grande relevância frente aos clínicos e autoridades de saúde, devido a alta resistência frente a classes importantes de ANTs usados no tratamento e na disseminação muito rápida dos determinantes de resistência por elementos genéticos móveis, entre diferentes espécies. Devido a este fato, de grande repercussão mundial, o foco deste estudo foi em BGN. A diversidade genotípica de *S. aureus* e *Enterococcus* spp. não foi avaliada por PFGE.

4.9. Análise dos perfis proteômicos por MALDI-TOF MS

Todos os BGN-F, BGN-NF e CGP, selecionados neste trabalho (n=282), foram analisados pela técnica de MALDI-TOF MS. Através da análise dos perfis proteômicos, foi obtida a identificação bacteriana. No MALDI-TOF MS, as linhagens bacterianas foram feitas em duplicata. No geral, quando os resultados obtidos pela técnica de MALDI-TOF MS foram comparados com testes fenotípicos convencionais e com o sistema automatizado VITEK®2, obtive-se uma boa concordância entre as diferentes análises.

A identificação por MALDI-TOF MS apresentou alto índice de similaridade espectral, na ordem dos 99%, para a maioria das linhagens e 96% (270/282) houve concordância com os resultados prévios obtidos no sistema VITEK®2, onde foram usados painéis com substratos químicos, para a identificação das bactérias, realizado no laboratório de microbiologia no HUCAM.

No presente estudo, apenas 1% (3/282) das linhagens bacterianas foram identificadas por MALDI-TOF MS apresentando 70% de similaridade espectral, considerado um baixo índice. Porém, estas linhagens tiveram a mesma identificação bacteriana reportada pelo sistema VITEK®2. Este fato ocorreu em 1 linhagem de *S. epidermidis* e 2 de

K. pneumoniae, (uma apresentava ESBL). Tal fato pode ter ocorrido pela dificuldade de lise da parede celular destas bactérias, não gerando bons espectros, em número suficiente para produzir um índice alto de similaridade espectral.

Para outros isolados, quatro apresentaram identificações discordantes por MALDI-TOF MS (4/282), em relação aos resultados prévios reportados pelo sistema VITEK®2. Uma linhagem de *S. epidermidis*, foi identificada como *E. coli* pelo MALDI-TOF MS, apresentando 99% de similaridade espectral. Uma linhagem de *P. aeruginosa,* também foi identificada como *E. coli* pelo MALDI-TOF MS, apresentando 99% de similaridade espectral. Duas linhagens de *K. pneumoniae,* também apresentaram identificações incoerentes, sendo uma identificada como *E. coli*, com 99% de similaridade espectral e a outra como *Acinetobacter haemolyticus* com apenas 70% de similaridade espectral.

Também observamos, que em 8 linhagens bacterianas (8/282), representado por BGN (n=6) e CGP (n=2), não foi gerado bons espectros, não apresentando identificação por MALDI-TOF MS (tabela 22). Tal fato pode ter ocorrido devido a dificuldade no processo da lise da parede celular destas bactérias. Estas linhagens bacterianas foram identificadas pelo VITEK®2, sendo *A. baumannii* (n=3), *P. aeruginosa* (n=2), *S. epidermidis* (n=1), *S. aureus* (n=1) e *E. coli* (n=1).Todas foram reavaliados pelos testes convencionais e automatizado, confirmando a identificação inicial.

Dessa forma, no geral, apenas 4% (n=12), das bactérias envolvidas neste estudo (12/282), não foram identificadas ou tiveram identificações contraditórias quando comparados ao sistema VITEK®2 e testes convencionais. Este fato ocorreu com mais frequência em BGN-NF (*A. baumannii* e *P. aeruginosa*) (tabela 22).

Tabela 22 - Comparação dos resultados obtidos pelo sistema VITEK®2 e MALDI-TOF MS, na identificação de 282 linhagens bacterianas.

Linhagens bacterianas	**Número de identificações no VITEK®2**	**Número (%) de isolados por MALDI-TOF MS Gênero e espécie**		
		Identificação correta	**Identificação incorreta**	**Não identificado**
K. pneumoniae	33	31 (94)	2 (6)	0
E. coli	33	32 (97)	1 (3)	0
P. aeruginosa	19	16 (85)	1 (5)	2 (10)
A. baumannii	22	19 (86)	0	3 (14)
S. aureus	88	87 (99)	0	1 (1)
S. epidermidis	56	54 (96)	1 (2)	1 (2)
E. faecium	12	12 (100)	0	0
E. gallinarium	2	2 (100)	0	0

4.10. Discussão

O número de infecções bacterianas tem aumentado nos últimos anos, em função do aumento do número de pacientes imunocomprometidos e dos processos invasivos realizados (Mayaud e Cadranel 2000). As infecções de corrente sanguínea (ICS) bacterianas são infecções graves de alto custo hospitalar e com significante mortalidade podendo atingir 40% ou mais, em algumas populações de pacientes hospitalizados (Weinstein *et al.,*1983). O laboratório de microbiologia clínica tem um papel importante na análise de amostras de pacientes com bacteremia, uma vez que a hemocultura positiva é um indicador altamente específico de ICS, principalmente quando o verdadeiro patógeno e/ou a susceptibilidade aos ANTs desviam-se do previsto pelo clínico.

A identificação rápida e precisa dos patógenos envolvidos nas infecções, contribui para a terapia adequada e o controle da disseminação dos microrganismos resistentes. Alguns genes que codificam as enzimas de resistência, apresentam alta motilidade, podendo ser facilmente disseminados intra e inter-espécies através de plasmídios (Diekema e Pfaller, 2013). A disseminação de genes de resistência tem grandes implicações, podendo ser constatada com a crescente resistência aos ANTs, através da existência de diferentes perfis de sensibilidade entre os patógenos. A escolha da terapia antimicrobiana para infecções por amostras resistentes aos carbapenêmicos é muito difícil devido ao fato deste fenótipo normalmente estar associado à multiresistência.

A colonização de pacientes internados por microrganismos resistentes é um dos problemas que profissionais da saúde enfrentam, porque podem resultar em infecções de alto risco, consideradas graves como a septicemia, devido a deficiências das defesas normais do hospedeiro. Devido a vários procedimentos invasivos, a incidência de infecções nosocomiais é comum, porque estes pacientes ficam susceptíveis a estas infecções, pois as barreiras da pele e mucosas estão normalmente comprometidas. Além disso, pacientes internados em setores como CTI apresentam doenças de base graves, imunossupressão e, muitas vezes, histórias de hospitalizações frequentes, levando à necessidade de uso de ANTs, o que aumenta o risco de desenvolvimento de infecções hospitalares por patógenos resistentes (Gales *et al*., 2004; Diekema e Pfaller, 2013).

No serviço de microbiologia clínica do HUCAM, no ano de 2010 foram realizadas 2690 hemoculturas com 19.4% de análises positivas. Foram identificados 522 microrganismos. O BGN mais frequentemente isolado foi *K. pneumoniae* (8%), com 61% cepas produtoras de ESBL, sequido de *E. coli* (6%) com 18% produtoras de ESBL, *A. baumannii* (5%) com 38% resistentes a carbapenêmicos e *P. aeruginosa* (4%), 25% resistentes a carbapenêmicos. O *Staphylococcus sp.* coagulase negativa foram os CGP mais predominantes, representando 34%, sendo 12% *S. epidermidis* com 52 % de cepas

resistentes a meticilina (oxacilina) e *S. aureus,* representando um número significante de isolados (11%), com 29% MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*). Estes dados justifica uma preocupação constante com o laudo rápido e preciso.

No presente estudo, realizado no ano 2011, foram realizadas 3.214 hemoculturas com 14.6% de análises positivas. Foram identificados 471 microrganismos sendo selecionados 282 linhagens bacterianas (60%), por serem os microrganismos mais isolados e apresentarem na literatura mundial, emergência de mecanismos de resistências relevantes, como a produção de ESBL, a produção de carbapenemases, as alterações nas PBPs e as alterações na permeabilidade da membrana, podendo gerar altas taxas de mortalidade. Nos BGN selecionados, *K. pneumoniae* e *E coli* foram os mais isolados com 7% cada, seguido de *A. baumannii* (5%) e *P. aeruginosa* (4%). Os CGP mais frequentes foram os *S. aureus* (18%), seguido por *S. epidermidis* (12%) e *Enterococcus* spp (7%). AS ICS polimicrobianas ocorreram em 9% dos pacientes (n=257), sendo 7% dos pacientes com duas hemoculturas positivas e 2% apresentaram três hemoculturas positivas, com coletas em dias distintos. Estes dados estão de acordo com os dados de Fysaraki *et al.,* 2013, que em um estudo conduzido entre 1999 a 2005 as ICS polimicrobianas ocorreram em 9.5% dos pacientes.

A CM foi o setor onde se observaram que não houve isolamento de *K. pneumoniae* ESBL, *P. aeruginosa* MDR e *Enterococcus* spp. VRE. A *E coli* ESBL, não foi isolada no CTI, sendo a maior frequência de isolamento neste setor de *A. baumannii* MDR (60%), o que é justificável porque os pacientes que vão para o CTI

são aqueles considerados casos graves, de alta complexidade e que necessitam de tratamento intensivo ou vigilância ininterrupta. O PS, se destaca também pela frequência alta de patógenos resistentes a importantes classes de ANTs: 45% de *E coli* ESBL, 50% de *K. pneumoniae* ESBL, 50% de *P. aeruginosa* MDR e 50% de *Enterococcus* spp. VRE. Também foi observado o maior número de isolamento de MRSA (31%). Concluimos que, neste setor foi prevalecente os BGN-F e CGP envolvidos neste estudo. O PS ocupou também a segunda posição em relação aos BGN-NF. No período deste estudo, o PS além de funcionar como emergência, ocorreu superlotação por motivo de falta de vagas nos outros setores do HUCAM, com leitos ocupados por pacientes graves, onde a permanência dos pacientes foi mais prolongada que a recomendada. A CCir, se destaca com o isolamento de CGP, principalmente o *S. aureus.* Os BGN-F e BGN-NF foram raros (n=2). O mesmo acontecendo com os setores CARDIO, HEMATO e NEFRO.

Neste presente trabalho, o primeiro trimestre ocorreu a maior frequência de isolamento das linhagens bacterianas (28%). Contudo, foram recuperadas durante todos os períodos do ano, exceto nos meses: abril, sem isolamento de enterobactérias e, setembro, sem isolamento de enterococos. Em maio, *S. epidermidis* teve o maior índice no ano de

isolamento, mas não houve isolamento no mês seguinte. Isto ocorreu provavelmente devido a ações de interferência, como o treinamento dos coletores de sangue, realizado pelo laboratório de microbiologia do HUCAM, visto que o *S. epidermidis* também é considerado um provável contaminante da pele.

Em relação a resistência a agentes ANTs, podemos destacar *A. baumannii*, com 55% de linhagens resistentes a carbapenêmicos e 51% de *K. pneumoniae* que expressaram fenótipo de ESBL. Os outros BGN apresentaram 21% das linhagens de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos, tendo a mesma frequência sido observada em *E coli*, que expressaram fenótipo de ESBL. Em CGP, os *Enterococcus* spp. apresentaram 45% das linhagens sendo VRE, *S. epidermidis* 57 % resistentes a meticilina (oxacilina) e *S. aureus* 44% de MRSA.

Estes dados obtidos quando comparados com o ano anterior demonstram o aumento expressivo da resistência a carbapenêmicos em *A. baumannii,* a grande maioria de *K. pneumoniae* continua sendo produtora de ESBL e as taxas de resistência a oxacilina aumentaram para o *S. aureus*. Isto pode ser um sinal de que os agentes ANTs necessitam ser utilizados com mais critério nos estabelecimentos de saúde, sendo de suma importância o uso controlado de ANTs a fim de não exercer uma pressão seletiva sobre as bactérias.

Os testes convencionais de susceptibilidade aos ANTs são indispensáveis, na detecção de perfis de resistência e escolha de agentes terapêuticos adequados, porém estes não são ferramentas ideais para rastrear a disseminação de bactérias dentro do ambiente hospitalar ou em uma comunidade. Ferramentas como métodos de tipagem molecular são mais apropriadas para o rastreamento. Para elucidar os mecanismos de resistência se faz necessário a determinação de genótipos de resistência, para sabermos se a resistência é devido a transmissão de genes de resistência entre diferentes bactérias ou se é devido a disseminação de uma única bactéria.

Dessa forma, com o objetivo de caracterizar o polimorfismo genético das linhagens bacterianas do nosso estudo, utilizamos a técnica de eletroforese de campo pulsado em gel de agarose (PFGE). Esta técnica permite separar fragmentos de DNA com alto peso molecular, variando entre 10 a 800 Kb (Olive e Bean, 1999). Possibilita a diferenciação de cepas com base nas variações qualitativas e quantitativas dos fragmentos gerados e é utilizada, essencialmente, para tipagem de amostras de uma mesma espécie, com base em suas diferenças clonais.

Para a caracterização de grupos clonais foi utilizado os critérios recomendados por Tenover e colaboradores, que propuseram um sistema para a padronização da interpretação dos resultados da técnica de PFGE, que consiste na análise da diversidade genética através da técnica de análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico após eletroforese em campo pulsado, com o objetivo de determinar a relação entre as

amostras possivelmente relacionadas a um surto. Amostras bacterianas que apresentam o mesmo perfil são consideradas a mesma linhagem. As que possuem diferença de uma a três bandas, refletindo um evento genético, são consideradas muito relacionadas. Amostras com diferenças de quatro a seis bandas, representando dois eventos genéticos distintos, são consideradas como possivelmente relacionadas. Aquelas contendo sete ou mais bandas de diferença, representando três ou mais eventos genéticos, são consideradas não correlacionadas (Tenover *et al.*,1995).

No presente estudo, para a detecção de genes de resistência foi utilizada a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em BGN-F e BGN-NF. A análise da diversidade genética através da técnica de PFGE foi realizado somente nos BGN, porque atualmente tem posição de destaque, com grande repercussão mundial, com relatos documentando a problemática da endemicidade de isolados clínicos de bactérias classificadas como MDR (resistência *in vitro,* a três ou mais classes de ANTs), devido o crescimento da presença e disseminação de genes de resistência das linhagens bacterianas de BGN-MDR, aliada a elevados índices de morbidade/mortalidade.

A *P. aeruginosa* é reconhecida como um dos principais agentes de infecções nosocomiais. São BGN aeróbios e móveis. Possuem necessidades nutricionais mínimas, sobrevivendo em uma grande variedade de ambientes, desenvolvendo-se facilmente em condições desfavoráveis. É uma bactéria invasiva e toxigênica. Possuem resistência intrínseca e uma fácil capacidade de desenvolver resistência a ANTs, estando associada com o aumento das taxas de morbidade e mortalidade e aumento do custo dos tratamentos dos pacientes infectados (Gales *et al.,* 2001a).

Nas últimas décadas, devido ao aumento da utilização de ANTs de amplo espectro, principalmente no CTI, tem se observado a emergência mundial de BGN MDR, incluindo *P. aeruginosa* produzindo surtos em diferentes países, inclusive o Brasil, principalmente devido a clones produtores de beta-lactamases tipo MBLs (Gales *et al.,* 2003; Witney *et al.,* 2014), chamando a atenção, devido a necessidade de vigilância no ambiente hospitalar.

No Brasil, surtos de infecção ocasionados por *P. aeruginosa* têm sido relacionados com uma disseminação clonal da espécie. Depois do primeiro relato de uma cepa de *P. aeruginosa* resistente a imipenem, de um paciente internado no Instituto de Oncologia Pediátrica de São Paulo, recuperada de infecção do trato urinário um clone MDR epidêmico produtor expressando a MBL SPM-1 (Toleman *et al*., 2002), denominado clone SP, vários trabalhos mostraram a disseminação deste clone, pelos estados brasileiros (Gales *et al.,* 2003; Poirel *et al.,* 2004; Sader *et al*., 2005, Carvalho *et al.,* 2006; Cipriano *et al.,* 2007; Gonçalves *et al.,* 2009). Também foram encontradas de *P. aeruginosa* produtoras de MBL do tipo IMP e 11 do tipo VIM (variantes alélicas não definidas), no mesmo hospital onde foi

descrita a primeira amostra de *P. aeruginosa* produtora de SPM (São Paulo) (Sader *et al*., 2004b).

Em um estudo realizado por Fonseca e colaboradores, determinaram a epidemiologia deste clone. As análises dessas amostras por PFGE em paralelo com MLST (*Multi Locus Sequence Typing*) mostraram que elas estavam agrupadas no clone SP e pertenciam ao ST277 (Fonseca *et al.,* 2010). Apesar de já ter sido descrito a presença do ST277 em outros países, apenas um relato na Suécia descreve a presença do ST277 carreando o gene bla_{SPM-1} fora do Brasil. Assim, o que parece é que a aquisição dessa enzima seja uma característica do ST277 no Brasil, refletindo a fuga do gene bla_{SPM-1} a partir de uma espécie não identificada, com a subsequente disseminação nacional e resultando em transferência internacional (Salabi *et al.,* 2010).

No presente estudo 21% das linhagens de *P. aeruginosa* (4/12) foram resistentes ao imipenem e meropenem e 50% foram classificadas como MDR, porque apresentaram resistência *in vitro,* a três ou mais classes de ANTs testados. Em 30% das hemoculturas com este patógeno, as culturas foram mistas, crescendo associada a outros patógenos, sendo isoladas com maior frequência em setores críticos como CTI e PS do HUCAM (50% cada), assim como as outras linhagens deste estudo. O PS justifica o isolamento deste patógeno nas mesmas proporções do CTI, devido a superlotação e falta de vagas (leitos) no HUCAM.

O CTI e a CM são os setores hospitalares onde o tempo de internação do paciente é prolongado, o uso de ANTs é mais intenso e os pacientes são submetidos a procedimentos invasivos. Estas características são determinantes para a seleção, colonização e dispersão de linhagens MDR. Um estudo dos fatores de risco para infecção por *P. aeruginosa*, realizado em um hospital universitário na França, mostraram que a maioria dos pacientes infectados com amostras de *P. aeruginosa* MDR (resistência a pelo menos três dos seguintes ANTs: ceftazidima, piperacilina, imipenem, ciprofloxacina, gentamicina e amicacina) encontrava-se hospitalizada em enfermarias de Clínica Médica (40%), Clínica Cirúrgica (21%) e CTI (19,3%) (Defez *et al.,* 2004).

No presente trabalho, a *P. aeruginosa* ocupou o quarto lugar na frequência dos BGN isolados de sangue e o octagésimo lugar geral de isolamento das bactérias. Em relação a outros beta-lactâmicos, em *P. aeruginosa* (n=19) envolvidas neste estudo, a maior taxa de resistência foi para cefotaxima (95%) e aztreonam (45%). O mesmo não foi observado com outras cefalosporinas de 3ª e 4ª geração, tais como a ceftazidima (10%) e cefepima (16%). A piperacilina/tazobactam também apresentou percentuais de baixa resistência (10%). O uso de fluorquinolona é muito comum nos hospitais e a resistência a este grupo importante de ANT, vem aumentando nos últimos anos. Felizmente, nestas linhagens de *P. aeruginosa*, 16% foram resistentes a ciprofloxacina. Entretanto para os aminoglicosídeos

(gentamicina 35% e amicacina 25%), estas taxas são mais expressivas quando comparamos estes dados com as *P. aeruginosa* não sensíveis aos carbapenêmicos, onde este percentual dobra (50% em gentamicina e amicacina), trazendo grande preocupação para os clínicos.

As CIMs dos carbapenêmicos, no grupo das linhagens sensíveis (15/19), variou de ≤ 0.25 a 4 µg/mL (VITEK®2), sendo que 60% apresentaram CIMs baixas de 0.25 µg/mL. Interessante lembrar que a interpretação da categoria de susceptibilidade seguiram as normas vigentes do ano da realização deste trabalho (2011), passando no ano seguinte, a ser classificada como intermediário a CIM de 4 µg/mL, permanecendo até os dias atuais. Neste caso, uma linhagem que foi classificada sensível neste trabalho, seria hoje classificada como resistente.

No presente estudo, as linhagens resistentes a carbapenêmicos no TSA, foi avaliado a acuidade dos resultados, realizando a CIMs pelo teste E-test®, que utiliza fitas plásticas, impregnadas com diferentes concentrações de ANTs. As CIMs foram altas em 100% dos casos, correspondendo a última diluição da fita E-test® (≥ 32 µg/mL), levando a maior confiabilidade na liberação desta resistência, visto serem muito poucas ou até mesmo única as opções de tratamento que possa ser usado no tratamento empírico monoterápico dessas infecções. Todas foram sensíveis a polimixina B, que é um ANT com considerável toxicidade. Em nenhuma destas linhagens de *P. aeruginosa,* houve discordância entre os resultados do sistema VITEK®2 e E-test®, apesar de termos um número muito pequeno para comparações.

Em estudo realizado em hospital terciário no Rio de Janeiro, encontraram altas taxas de resistência a vários ANTs em amostras de *P. aeruginosa* imipenem resistentes, inclusive para aztreonam (85% de amostras resistentes), onde podemos concluir que a resistência em nosso meio é uma realidade (Kokis *et al.,* 2005).

Desde 2001, Gales e colaboradores mostraram que na América Latina, 8,2% das amostras de *P. aeruginosa* foram consideradas MDR, enquanto que na Europa e EUA, o percentual de multiresistência foi de 4,7% e 1,2%, respectivamente (Gales *et al*., 2001a). Existem vários critérios para considerar uma amostra de *P. aeruginosa* MDR e as definições nos estudos publicados não são uniformes, dificultando possíveis comparações (Defez *et al*., 2004; Obritsch *et al*., 2004).

O principal mecanismo de resistência ao imipenem em *P. aeruginosa* é a diminuição da permeabilidade da membrana externa, devido a modificações na expressão ou a perda da porina OprD (46kD). Isto pode ocorrer em 50% dos pacientes com infecções tratadas com imipenem depois de sete dias (Hancock, 1998). Outro mecanismo é a expressão do sistema de efluxo MexEF-OprN que leva à diminuição da produção de OprD (Maseda *et al.,* 2000). A resistência ao meropenem ocorre devido à superexpressão do sistema de efluxo

MexAB-OprM (Ziha-Zarifi *et al*., 1999). Em nosso trabalho, só tivemos um caso (1/19) que foi imipenem resistente e meropenem sensivel, provavelmente devido aos mecanismos descritos. Não foi incluída nas linhagens resistentes aos carbapenêmicos, descritas no presente estudo.

Em 2004, Sader e colaboradores, mostraram que 49% das 247 amostras de *P. aeruginosa* isoladas em hospitais brasileiros participantes do programa de vigilância SENTRY, em 2001, já apresentavam resistência ao imipenem (Sader *et al.,* 2004a). Resistência a altas concentrações de carbapenêmicos, em *P. aeruginosa*, tem sido associada à aquisição e expressão de carbapenemases do grupo das metalo-beta-lactamase (MBL). Estas enzimas causam resistência a todos os beta-lactâmicos, com exceção do aztreonam (Toleman *et al*., 2002; Castanheira *et al*., 2004), que apresentou 45% de resistente nas nossas linhagens.

Desde o inicio da década de 1990, genes que codificam MBLs, tem sido descritos em patógenos clinicamente importantes, que não produzem naturalmente estas enzimas como *Pseudomonas* spp, *Acinetobacter* spp. e gêneros da família *Enterobacteriaceae.* Em razão dos inúmeros relatos de bactérias produtoras de MBLs em regiões do mundo, houve a necessidade de desenvolver testes simples, práticos e de baixo custo, para tornar possível o rastreamento destas bactérias. As MBLs necessitam de íons divalentes como o zinco, que funcionam como co-fator para a reação de hidrólise de beta-lactâmico, portanto estas enzimas podem ser identificadas por testes fenotípicos com auxilio de quelantes de zinco como o EDTA. Outro inibidor também utilizado é o MPA cuja acão se deve a capacidade de interferir na estrutura molecular da MBL (Crowder *et al.,* 1998).

No presente trabalho, *P. aeruginosa*, que apresentaram este perfil de resistência a carbapenêmicos (n=4), realizamos o teste de MBLs, proposto por Arakawa e colaboradores, um método simples de sinergismo de duplo disco empregando inibidores de MBL, como o ácido 2-mercaptopropiônico (MPA), e o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) com a ceftazidima (CAZ) e imipenem (IMP), para a detecção de BGN presuntivamente produtores de MBLs. O teste pode ser utilizado com discos contendo qualquer beta-lactâmico de amplo espectro (Arakawa *et al*., 2000). Entretanto, a ceftazidima pareceu ser o substrato mais sensível, já que amostras produtoras de IMP-1 normalmente apresentam resistência a altos níveis de ceftazidima e podem demonstrar vários níveis de resistência ao imipenem (CIM de 4 a >128µg/mL).

Também foi demonstrado a eficácia deste método proposto por Arakawa e colaboradores em 2000, para a detecção de amostras produtoras de outras enzimas MBL como a VIM-2, em 21 das 209 amostras de *Pseudomonas* isoladas em Taiwan. Todas os 21 isolados apresentaram resultados positivos para detecção do gene através da técnica de PCR, sendo 16 positivas para bla_{VIM-2} e cinco para bla_{IMP-1} (Yan *et al.,* 2001).

Entre as linhagens de *P. aeruginosa* do presente trabalho, 100% demonstraram produção de MBLs. A detecção destas amostras configura um problema emergente, com importantes implicações na terapêutica antimicrobiana, necessitando, portanto, de maior investigação através de metodologia molecular, para melhor caracterizar a extensão do problema e confirmar a presença de genes codificadores desta carbapenemase.

Métodos moleculares, como PCR, têm auxiliado na detecção de MBLs (Gales *et al*., 2003). Entretanto, com o número cada vez maior de MBLs descritas no mundo e com a globalização, onde o fluxo de pessoas viajando entre países (a trabalho, turismo ou hospitalizações) aumentaram muito, fatores importantes para a aquisição e dispersão de microrganismos MDR, torna-se necessário o uso de vários iniciadores diferentes. Assim, este método não é muito viável para o uso em laboratórios clínicos devido ao alto custo e necessidade de técnicos especializados para a sua execução. Dessa forma, métodos mais simples para a detecção de MBLs são essenciais para a sua rápida detecção como o proposto por Arakawa e colaboradores (2000), além de estudos sobre a prevalência destas enzimas.

A emergência de cepas com essas características é preocupante, tendo em vista a escassez de terapias efetivas no tratamento de infecções por esse patógeno. Finalmente, com base em relatos nacionais, publicados por diferentes grupos de pesquisa, podemos deduzir que a convergência de múltiplos mecanismos de resistência em *P. aeruginosa* tem sido um evento favorável para a seleção de diferentes clones endêmicos MDR disseminados no Brasil.

Nenhuma destas linhagens deste estudo, foram positivas para o principal gene de resistência a carbapenêmicos, disseminado em nosso país, o $bla_{\text{SPM-1,}}$ realizada pela técnica de PCR. Então foi também utilizado iniciadores para a detecção dos outros genes codificadores de carbapenemases, $bla_{\text{IMP,}}$ $bla_{\text{VIM-1,}}$ $bla_{\text{VIM-2}}$,bla_{KPC} e bla_{NDM} e não houve amplificação para nenhum dos genes pesquisados.

Resistência ao imipenem e/ou meropenem também pode ser causada pela produção de carbapenemases pertencentes ao grupo das serina-beta-lactamases (Poirel *et al*., 2001) ou das oxacilinases (Poirel *et al*., 2005). Apesar de já terem sido descritas várias carbapenemases pertencentes a estes grupos em diferentes espécies de *Enterobacteriaceae* e em *Acinetobacter*, até o momento, em *P. aeruginosa*, só foi descrita uma carbapenemase do grupo das serina-beta-lactamases, a GES-2 (Poirel *et al*., 2001), que não foi pesquisada em nosso trabalho.

Podemos concluir neste presente estudo, que a resistência aos carbapenêmicos e a ausência dos genes pesquisados que frequentemente são encontrados nestas linhagens bacterianas, seja devida a uma associação de mecanismos de resistência, como perda de porina, superexpressão de sistemas de efluxo e β-lactamases cromossômicas (Livermore,

1992) ou ainda, pela produção de outras carbapenemases não pesquisadas por reação de PCR.

Pelo PFGE, realizado neste presente estudo, nas linhagens de *P. aeruginosa*, sensíveis e resistente a carbapenêmicos, foi observado grande diversidade clonal, não ocorrendo disseminação de clones no HUCAM. Um paciente apresentou dois perfis diferentes de *P. aeruginosa*, em amostras de sangue coletadas em dias diferentes, podendo ser caracterizado como infecções diferentes ou colonização por diferentes linhagens. Marchandin e colaboradores, também relataram a colonização e/ou infecção por diferentes clones de *P. aeruginosa* em um mesmo paciente (Marchandin *et al.,* 2000).

A *Acinetobacter baumannii,* a partir da década de 70, começou a ser identificada como patógeno nosocomial e se apresentavam como bactérias sensíveis aos ANTs utilizados no tratamento, sendo facilmente tratadas (Bergogne-Bérézin e Towner, 1996). Ao longo dos anos, a presença em infecções foi subestimado e por estas bactérias apresentarem alto poder de adaptação, resistência e disseminação, foi originando linhagens cada vez mais resistentes, devido o uso indiscriminado de ANTs de amplo espectro. Portanto, foram surgindo os isolados clínicos de *A. baumannii* MDR e se tornaram um importante patógeno capaz de causar infecções nosocomiais de difícil tratamento (Towner, 2009; Manchanda *et al*., 2010). Nos últimos anos, diversos genes de resistência tem sido encontrado em *Acinetobacter* spp, especialmente na espécie *A. baumannii.*

No presente estudo, no geral foi o terceiro mais prevalente dos BGN em ICS, com 5% dos isolados (22/471). As fontes de bacteremia mais frequentes tem sido o sistema respiratório e uso cateteres venosos, afetando pacientes de todas as idades com maior frequência nos idosos e os recém nascidos devido ao baixo peso, nutrição parenteral e sistema imune inato não estar totalmente desenvolvido. Sua taxa de mortalidade varia entre 20 a 60% e vem aumentando (Papagheorghe, 2012).

Nas linhagens deste presente estudo (n=22), 82% das amostras apresentaram resistência a cefotaxima e a cefepima, 64% a ceftazidima, 82% piperacilina/tazobactam, 55% resistentes a ciprofloxacina, 30% a gentamicina e 5% a amicacina. Para o ANT beta-lactâmico associado a inibidor de beta-lactamases, a ampicilina/sulbactam apresentou 68% de resistência em *A. baumannii,* dados preocupantes por ser considerada uma opção terapêutica segura e eficaz (Levin *et al.,* 2003). Neste presente estudo, podemos avaliar o perfil de gravidade dos pacientes que adquiram ICS por *A. baumannii* porque em 50% das hemoculturas, apresentaram crescimento com associação de outras bactérias GN e GP, inclusive a presença de *E. faecium* VRE em 36% dos casos, provenientes dos setores CTI e PS.

A maioria das A. *baumannii* foram resistentes a carbapenêmicos 55% (12/22) etiveram 60 % de seu isolamento no CTI, seguida do PS e CM (16% cada), distribuídas ao

longo dos meses, não apresentando maior ocorrência de casos, em determinado período do ano. O valor elevado das CIMs ≥ 32 µg/mL, caracterizam altas taxas de resistência. Este valor correspondem a última diluição da fita, podendo as CIMs serem bem mais elevadas. Apresentaram resistência a três ou mais classes de ANTs testados, em 83% dos casos, mostrando um fenótipo de resistência MDR. Todas foram sensíveis a polimixina B, considerada a única opção terapêutica. Estes patógenos mostram-se adaptados a causar este tipo de infecção e sua erradicação de difícil tratamento, pelas limitações terapêuticas.

No Brasil, as carbapenemases da classe D de Ambler (Ambler, 1980), são chamadas de oxacilinases, que formam um grupo heterogênio de acordo com suas propriedades estruturais e bioquímicas. Estas oxacilinases apresentam baixa atividade hidrolitica aos carbapenêmicos, porem estão entre os mecanismos de resistência a carbapenêmicos mais comuns em *Acinetobacter* spp. Embora a maioria dessa enzima sejam codificadas por genes inseridos em cassetes de integron da classe 1, estudos recentes tem demonstrado que podem estar em outras estruturas como sequências de inserção e transposon (Poirel *et al.,* 2010).

Atualmente, são encontrados diferentes subgrupos de oxacilinases com atividade sobre os carbapenêmicos, algumas pesquisadas neste trabalho como a OXA-23, OXA-24, OXA-51, OXA-58, OXA-143 (Poirel *et al.,* 2010). A OXA-51 constitui um subgrupo de enzima cromossômica que é intrínseca a espécie *A. baumannii* (Heritier *et al*., 2005). A presença destas enzimas confere diferentes níveis de resistência e a coexistência com uma outra oxacilinase é comum (Carvalho *et al.,* 2009).

No presente estudo, todas as linhagens de *Acinetobacter* foram identificadas como *A. baumannii,* pelo VITEK®2. Apenas uma linhagem (11/12) não foi detectado o gene $bla_{\text{OXA-23,}}$ que esteve presente em 92%. Nesta linhagem, foi detectado o gene $bla_{\text{OXA-58}}$. Em uma (1/12), não foi detectado o gene $bla_{\text{OXA-51,}}$ que é característico de *A. baumannii* (Turton *et al.,* 2006), portanto esta linhagem não seja *A. baumannii* e provavelmente seja uma linhagem do complexo *A. baumannii-calcoaceticus*, representada por outras espécies.
Entretanto, relatos tem sido feitos de espécies não-*baumannii* carreando o gene $bla_{\text{OXA-51,}}$ que é característico de *A. baumannii*. O primeiro relato foi em *A. nosocomialis,* pertencente ao complexo *A. baumannii-calcoaceticus,* em Taiwan, que apresentou um plasmídio de 50Kb com este gene, apresentando a sequência de inserção ISAba1 a montante do gene, o que sugere sua origem em *A. baumannii,* após este relato outras cepas da espécie *A. nosocomialis* foram isoladas carreando este gene, a princípio todas pertencentes ao mesmo clone (Lee *et al.,* 2012). Na América Latina o primeiro relato foi no Brasil na cidade de Porto Alegre, onde diferente dos isolados encontrados em Taiwan, os isolados brasileiros apresentaram os genes de carbapenemases $bla_{\text{OXA-23}}$ e gene $bla_{\text{OXA-51,}}$ estando a sequência

de inserção ISAba1 adiante ao gene blaOXA-23-like e foram resistêntes aos carbapenêmicos (Teixeira *et al.,* 2013).

A identificação de espécies não-*baumannii* produtores de OXA-51 e/ou OXA-23 é preocupante uma vez que espécies menos frequentes que o *A. baumannii* podem se tornar frequentes em infecções hospitalares devido a resistência ao tratamento, obtida a partir da aquisição destes genes. A aquisição destes genes pode se dar por plasmídios formados por eventos de transposição indepententes em diferentes cepas de *A. baumannii* (Lee *et al.,* 2012).

A maioria dos laboratórios de microbiologia clínica não possuem capacidade para testes moleculares. Estes dados mostram que linhagens de *Acinetobacter*, devem ser reportadas como complexo *A. baumannii-calcoaceticus*. Entretanto, isto dificulta a real caracterização da epidemiologia, patogenicidade e impacto clínico de cepas de *A. baumannii, porque* espécies menos frequentes, podem estar associadas a infecções, como *A. nosocomialis, A. pitti, A. lowoffi, A. haemolyticus, A. johnsonii* e outras. Diante desta dificuldade, diversos estudos discutem a melhor maneira de identificação das espécies dentro do complexo. A identificação da espécie *A. baumannii* pela detecção do gene $bla_{\text{OXA-51,}}$ vem se tornando, gradativamente, uma opção não satisfatória, primeiramente pelos relatos de não-*baumannii* carreando este gene, o que deixa de ser um marcador para a espécie *A. baumannii,* um outro fato diz respeito a variabilidade genética da espécie *A. baumannii.*

Além disto, estudos mostram que o gene $bla_{\text{OXA-51,}}$ pode ser interrompido por outras sequências de nucleotídeos, como as sequências de inserção, então na PCR, a banda esperada para este gene é modificada, obtendo tamanhos de bandas diferentes (Zander *et al.,* 2013). Apesar destes achados, a identificação realizada no nosso estudo foi conduzida com controles conhecidos e conservados sobre os genes de oxacilinases. A confirmação da espécie pelo sequenciamento do gene rpoB não foi realizada, por não fazer parte dos nossos objetivos.

Apesar do método de MLST ser uma poderosa ferramenta para estudos epidemiológicos e populacionais de cepas clínicas importantes de *A. baumannii* porque fornece uma estratégia de conhecimento mundial da população clonal das linhagens bacterianas de relevância clínica, o seu poder discriminatório é comparável com PFGE, que foi realizado no presente estudo com o objetivo investigativo para verificar se houve presença de clones e disseminação de *A. baumanni* no HUCAM, aonde este patógeno vem sendo recuperado de forma crescente. Os resultados mostraram que houve grande diversidade genética, com apenas duas linhagens com o mesmo perfil, estando estreitamente correlacionadas, apresentando acima de 96% de similaridade, recuperadas em julho e setembro de pacientes provenientes de diferentes setores CTI e PS,

respectivamente. Este dado indica que houve transmissão desta linhagem bacteriana, entre os setores do HUCAM. *A. baumannii* tem mostrado grande capacidade de disseminação e poder de causar surtos, representando um problema mundial de saúde pública.

A *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* são BGN, da família *Enterobacteriaceae*, anaeróbios facultativos e não formam esporos. Podem ser encontrados no trato intestinal de humanos e animais, mas também estão presentes em outros ambientes como na vegetação, no solo e água (Koneman *et al.,* 2008). Estas linhagens bacterianas vêm apresentando elevadas taxas de resistência às variadas classes de ANTs, principalmente a classe dos beta-lactâmicos, devido à produção de diferentes enzimas que codificam os mais variados genes de resistência.

As beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs), tem sido frequentemente encontradas em BGN da família *Enterobacteriaceae,* principalmente *K. pneumoniae* e *E.coli.* Existem mais de 500 diferentes tipos de ESBL descritas na literatura, sendo a maioria derivada das enzimas CTX-M, SHV e TEM, as mais reportadas na literatura. Dentre estas, a enzima CTX-M, tem sido a mais prevalente, encontrada em diversas regiões do mundo, sendo as variantes alélicas CTX-M-14 e CTX-M-15 as mais encontradas (Kim *et al.,* 2014). O gene $bla_{\text{CTX-M-15,}}$ está associado a elementos de transposição e plasmídios que contém outros genes de resistência, fazendo assim com que estas linhagens, tenha altos níveis de resistência a diferentes classes de ANTs: beta-lactâmicos, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e sulfonamidas, tornando-se motivo de preocupação em todo o mundo (Karisik *et al.,* 2008).

As bactérias produtoras de ESBL vem sendo encontradas no ambiente hospitalar e na comunidade e são capazes de hidrolisar penicilinas de amplo espectro, cefalosporinas e monobactâmicos (Gales *et al.,* 2012). Atualmente, as opções terapêuticas para o tratamento das infecções são limitadas, muitas vezes restringindo-se ao uso de carbapenêmicos disponíveis em nosso meio (imipenem, meropenem ou ertapenem). O uso aumentado dos carbapenêmicos tem contribuído para o surgimento mundial de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos. Devido à importância da detecção de enzimas produtoras de ESBL e carbapenemases, métodos de triagem e confirmatórios devem ser realizados, rotineiramente, para pesquisar a produção destas enzimas, porque permite ao médico selecionar o ANT adequado, evitando medicamentos ineficazes e de alto custo.

Neste presente estudo, as 66 linhagens pesquisadas de BGN-F, representadas por *K. pneumoniae* e *E.coli*, 36% apresentaram um perfil de resistência com possível produção de beta-lactamases tipo ESBL pela expressão da atividade de enzimas produzidas por estes patógenos, no teste fenotípico (24/66). Este valor aumenta quando analizamos estas linhagens individualmente. A maior prevalência foi em *K. pneumoniae* (17/33), representando 51%. Em *E. coli* a prevalência foi de 21% (7/33). O sistema automatizado

VITEK®2, apresentou concordância com os resultados, quando comparados com o teste fenotípico, mostrando ser uma tecnologia eficaz.

Neste grupo, a resistência foi alta para aztreonam (87%), cefepime (92%), cefotaxima (96%), ceftazidima (83%). Quanto a sensibilidade aos carbapenêmicos, 100% das *E. coli* que expressaram atividade ESBL (teste positivo), foram sensíveis aos carbapenêmicos, o mesmo não acontecendo com *K. pneumoniae,* 12% das linhagens (2/17), apresentaram resistência a ertapenem, com uma delas também resistentes a imipenem e meropenem (6%). Isto demonstra a provável associação de genes de resistência.

No presente trabalho, foram pesquisados os seguintes genes codificadores de beta-lactamases em ESBL: bla_{SHV}, bla_{TEM}, bla_{CTX-M} e especificamente a variante alélica $bla_{CTX-M-15}$, assim como os genes codificadores de carbapenemases: bla_{KPC}, bla_{OXA-48}, bla_{IMP1}, bla_{IMP2}, bla_{IMP4}, bla_{VIM1}, bla_{VIM2} e bla_{NDM}.

A epidemiologia global tem demonstrado que a ESBL mais frequentemente descrita no mundo, em enterobactérias é a do tipo CTX-M, não somente em ambiente hospitalar como comunitário. Nas décadas de 1980 e 1990, as enzimas prevalentes eram do tipo SHV e TEM (Carrër e Nordmann, 2011). Na França um estudo entre os anos 1999 e 2007, mostrou que em 1999 a enzima TEM era a mais prevalente e em 2007, sendo a CTX-M, com a CTX-M-15 o subtipo mais encontrado (Anastay *et al.,* 2013).

Em um trabalho recente, realizado no norte de Portugal, com 193 isolados de BGN, as ESBLs foram recuperadas em *E. coli* (67.9%) e *K. pneumoniae* (30.6%). A enzima mais prevalente foi TEM (40.9%), seguida de CTX-M (37.3%) e SHV (23.3%), concluindo que neste país, a enzima TEM permanece a mais prevalente, mas com CTX-M, crescendo rapidamente (Fernandes *et al.,* 2014).

Nas enterobactérias deste presente estudo (*K. pneumoniae* e *E.coli)*, a enzima TEM foi a mais encontrada com 58% (14/24) nas amostras de ESBL, seguida de CTX- M com 42% (10/24) e SHV com 25% (6/24). Estes dados estão de acordo com os dados de Fernandes e colaboradores (Fernandes *et al.,* 2014), entretanto segundo Livermore e colaboradores, enzimas do tipo CTX-M são descritas como a mais frequente nestes gêneros (Livermore *et al.,* 2007). Com estes dados, podemos afirmar que 42% das nossas linhagens, eram verdadeiras produtoras de ESBL, visto que todas as enzimas do tipo CTX-M são consideradas verdadeiras ESBLs. A presença dos genes bla_{SHV} e bla_{TEM}, nos gêneros pesquisados, não pode-se confirmar que estas linhagens sejam ESBLs só pelo teste fenotípico sem realizar o sequenciamento dos produtos amplificados destes genes, porque algumas das enzimas do tipo SHV e TEM não apresentam fenótipo ESBL (SHV-4, SHV-10, SHV-11, TEM-1, TEM-2 e TEM-13) (Jacob *et al.,* 2011). O sequenciamento não fazia parte dos objetivos do presente estudo.

Analizando a frequência destes genes para cada gênero estudado, observamos que a enzima SHV não foi encontrada em *E. coli,* mas 35% das *K. pneumoniae,* carreavam o gene *bla*$_{SHV.}$ Esta enzima SHV, foi descrita em *E. coli* em diferentes partes do mundo, no Equador em 27% das *E.coli*, nos EUA em linhagens de 30 comunidades coletadas em cinco hospitais na India onde *E. coli* foi o patógeno que mais expressava atividade de ESBL (Mattar e Martinez 2007; Kargar *et al*; 2014; Hu *et al.,* 2014).

No nosso estudo a enzima TEM, foi mais prevalente em *E. coli* com 71%, seguido de *K. pneumoniae* com 53%. A enzima CTX-M, também foi mais prevalente em *E. coli* (71%). Em *K. pneumoniae,* somente 29% das linhagens apresentaram esta enzima.

No entanto, 80% das linhagens de *K. pneumoniae* presentes com a enzima CTX- M, foi encontrado a variante alélica *bla*$_{CTX-M-15.}$ O mesmo não ocorrendo em *E. coli,* com apenas 20%. Estes dados nos chama a atenção, porque 71% das *E.coli* ESBL positivas, carreavam o gene *bla*$_{CTX-M,}$ e apenas aproximadamente em um terço das *K. pneumoniae* pesquisadas (29%), tinham este gene. Dessa forma, pode-se evidenciar que a grande maioria *das E. coli* (71%), podem ser classificadas como verdadeira ESBL e a variante alélica *bla*$_{CTX-M-15,}$ não foi a enzima mais prevalente (20%). O mesmo não aconteceu em *K. pneumoniae* que apresentaram o teste fenotípico positivo para ESBL e em apenas 29% podemos ter esta certeza, sendo classificadas como verdadeiras ESBL, porque carreavam o gene *bla*$_{CTX-M,}$ sendo a variante alélica *bla*$_{CTX-M-15,}$ a mais prevalente (80%). Outro fato curioso é que obteve-se maior número de testes fenotípicos falsos positivos em *K. pneumoniae,* porque aproximadamente um terço (29%), não foi detectado a presença de nenhum dos genes pesquisados (5/17). O mesmo não ocorreu em *E. coli* em que todas as linhagens foi encontrado os genes codificadores de ESBL.

Foi observado no presente estudo, associações de genes codificadores de ESBL. A associação de TEM e SHV foi a mais prevalente em *K. pneumoniae* (17% das amostras) e em *E.coli* a associação de TEM e CTX-M foi presente em 43% das linhagens, mostrando a facilidade de aquisição de múltiplos genes. Nesta pesquisa, 21% dos BGN-F, não apresentaram nenhum dos genes frequentemente envolvidos em ESBL, podendo haver a presença de outros genes, não pesquisados.

Na família *Enterobacteriaceae*, a resistência aos carbapenêmicos é principalmente associada à produção de enzimas carbapenemases como a *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase *(*KPC) e *New Delhi metallo-beta-lactamase* (NDM), que possuem um alto potencial de disseminação via elementos genéticos móveis e se tornaram fator preocupante no meio hospitalar, no mundo inteiro, porque são enzimas capazes de hidrolisar todos os beta-lactâmicos e frequentemente são também resistentes a múltiplas classes de agentes ANTs como aminoglicosídeos e fluorquinolonas (Bush *et al*., 2010; Nordmann*et al.,* 2011; Nordmann e Cornaglia, 2012). Estes genes *bla*$_{KPC}$ e *bla*$_{NDM,}$ tem grande capacidade de

disseminação e altas taxas de mortalidade associadas a infecções. Representam uma grande ameaça para os dias atuais (Bush *et al.,* 1995; Yong *et al.,* 2009; Grupta *et al.,* 2011).

A aquisição de plasmídios transferíveis carreando o gene bla_{KPC} através de amostras endêmicas locais ou por plasmídios carreadores de genes de ESBL por clones epidêmicos de amostras produtoras de KPC, explica a frequente associação de ESBLs com KPC. Através dessas estruturas genéticas, os genes de resistência podem se acumular em plasmídios, que quando mobilizados, serão transferidos a outra bactéria levando todos esses determinantes de resistência juntos.

Devido a alta resistência a diferentes classes de ANTs, poucas são as opções de tratamento para os pacientes infectados com bactérias produtoras de KPC e se tornou um grande problema de saúde pública, tanto no Brasil, como em outros países, visto que este mecanismo de resistência se encontra disseminado. Essas drogas são principalmente as polimixinas e a tigeciclina (Hirsch e Tam, 2010). Porém estudos mostram o aumento da resistência a estas drogas e isto demonstra a razão da grande preocupação mundial atual.

Em um estudo compreendendo 7 hospitais chineses, 89 isolados de diferentes espécies da família Enterobacteriaceae (82 produtoras de KPC), 60% foram resistentes a tigeciclina (Zhang *et al.,* 2011). No Reino unido, em 11 isolados produtores de KPC, 9 foram resistentes a tigeciclina (82%) (Livermore *et al.,* 2011). Um estudo com 16 pacientes que tinham culturas de sangue persistentemente positivas apesar de mais de 3 dias de tratamento com polimixina B (n=12) ou polimixina B e tigeciclina, 25% apresentaram resistência à polimixina B em *K. pneumoniae* (Lee *et al.,* 2009). Além disto, as polimixinas apresentam alta toxicidade e a tigeciclina, ainda não possui padronização no CLSI e não é recomendada para infecções de corrente sanguínea.

Os carbapenêmicos vêm sendo utilizados na prática medica cada vez mais, criando uma grande pressão seletiva sobre a microbiota hospitalar, o que pode ocasionar aumento da resistência a esses agentes, surgindo o aumento de BGN-F com enzimas que pertencem à classe B de Ambler (Bush,1998), ou metalo beta-lactamases (MBL), não só na América Latina mas em muitos países, necessitando sua detecção. A produção dessas enzimas tem sido comumente responsável pelo fenótipo de resistência a betalactâmicos, hidrolisando todos os betalactâmicos comercialmente disponíveis, sendo a única exceção de tratamento quando sensíveis o monobactam, como o aztreonam (Bush,1998; Toleman *et al.,* 2002).

Como essas enzimas são inibidas pelo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) ou por compostos derivados do ácido tiolático (ácido 2-mercaptopropiônico) (Bush *et al.,* 1995), foi realizado em nosso laboratório o teste presuntivo de MBL para as linhagens com suspeita da presença de carbapenemases, também em enterobactérias. Porém, estes resultados apresentam limitações, devido os critérios de triagem conflitantes, podendo

variar de acordo com o substrato, o agente quelante utilizado e a linhagem bacteriana (Arakawa *et al*., 2000, Lee *et al.,* 2003). Portanto, ainda não existe um consenso entre os autores e de padronização pelos comitês de teste de sensibilidade, necessitando métodos moleculares para confirmação, muitas vezes de difícil acesso e que não são implantados na rotina laboratorial, devido ao custo elevado e mão de obra específica.

Até o presente momento, o CLSI não sugere nenhum teste para detecção de amostras produtoras de MBL, uma vez que esses mecanismos de resistência não são prevalentes nos EUA. No entanto, foi constatado que 41,3% das amostras de *P. aeruginosa,* resistentes a carbapenêmicos isoladas de distintos hospitais brasileiros eram produtoras de MBL, evidenciando uma realidade diferente daquela encontrada nos EUA (Gales *et al.,* 2003), enfatizando a necessidade da realização de testes de detecção para esse fenótipo de resistência em nossos laboratórios de microbiologia, visto que estes genes são tranferíveis, apresentam alta motilidade, podendo ser facilmente disseminadas intra e inter-espécies.

Entre as MBLs, está a New Delhi metalo beta-lactamase (NDM), que teve seu primeiro isolamento em *K pneumoniae* em 2009, em um paciente da Suíça tendo sido previamente hospitalizado na Índia em 2008 (Yong *et al.,* 2009) e desde então, diferentes gêneros bacterianos tem sido isolados principalmente na Índia. No Brasil o primeiro isolamento de MBL em *K pneumoniae* foi em 2003, que foi previamente suspeitada pelo teste presuntivo para MBLs, usando os mesmos discos e inibidores que usamos no presente trabalho. Foi confirmado a presença do gene bla_{IMP-1} (Lincopan *et al.,* 2005). A NDM também tem sido reportada em outros gêneros de enterobactérias, como *Salmonella* spp., *E.coli, Enterobacter cloacae, Providencia rettgeri, Raoutella ornithinolytica* (Huang *et al.,* 2013; Zhou *et al.,* 2014b) e também em linhagens que não apresentaram resistência plena a todos os carbapenêmicos . Em 2013, no Brasil foi detectada a primeira *Providencia rettgeri* com este gene de resistência, imipenem resistente, meropenem e ertapenem sensível (Carvalho-Assef *et al.,* 2013).

Seguindo as recomendações da nota técnica da ANVISA ou o CLSI 2011, recomenda-se para a confirmação fenotípica da produção de carbapenemase, a execução do teste de Hodge modificado, que apresenta limitações, como a falta de especificidade para o grupo de carbapenemase e também apresentando baixa sensibilidade (≤50%) para detecção de NDM (Girlich *et al.,* 2012). Além disto, algumas amostras produtoras de ESBLs, principalmente CTX-M, que apresentam outros mecanismos de resistência associados, como perda de porinas ou aumento da expressão de bombas de efluxo, podem ocasionar resultados falso positivos fazendo com que estas amostras sejam falsamente indicadas como produtoras de carbapenemases (Pasteran *et al*., 2010). Métodos moleculares são importantes para confirmação da presença de carbapenemases.

De acordo com as recomendações da nota técnica da ANVISA ou o CLSI 2011, (até os dias atuais), as CIMs de susceptibilidade aos carbapenêmicos, para descriminação entre sensível, intermediário e resistente para imipenem e meropenem são respectivamente 1/2/4 ug/mL. Estes valores variam para ertapenem que segundo o CLSI, esses valores são 0,25/0,5/1ug/mL e de acordo com a ANVISA são 0,5/1/2ug/mL (Anvisa, 2010). Ambos os órgãos preconizam que as cepas consideradas não sensíveis (agrupadas em resistentes e intermediárias) ao imipenem e meropenem devem ser consideradas possíveis produtoras de carbapenemases e nessas cepas deve ser realizada a detecção molecular do mecanismo de resistência (PCR para detecção de KPC, NDM, VIM entre outros), sendo importantes para a confirmação da presença de carbapenemases.

No presente estudo apenas 12% (2/17) de *K. pneumoniae* ESBL positiva (Kp157 e Kp180), apresentaram resistência a ertapenem. Nenhuma apresentou resistência plena a imipenem e meropenem. Todas foram resistentes a caftazidima. Foi realizado nestas linhagens a pesquisa de genes codificadores de carbapenemases bla_{KPC} e $bla_{NDM.}$ A *K. pneumoniae* (Kp180),carreava o gene bla_{TEM} e deu teste fenotípico de Hodge positivo, com CIMs mais elevada para imipenem e meropenem (2 µg/mL) no VITEK®2 e no E-test® CIM de 4 µg/mL, ambos classificados na categoria de intermediário, pelas normas vigentes do ano do estudo, que hoje seriam consideradas resistentes. O resultado genotípico foi positivo para KPC (Kp180), recuperada no setor CTI, que no geral teve um índice elevado de isolamento de patógenos. A *K. pneumoniae* (Kp157), carreava os genes $bla_{SHV,}$ bla_{CTX-M} e variante alélica $bla_{CTX-M-15}$ e deu teste presuntivo para MBL positivo, apesar das CIMs baixas para imipenem e meropenem (1 µg/mL). O resultado genotípico foi positivo para VIM-1, mostrando a importância da realização dos testes fenotípicos no diagnóstico rápido em casos suspeitos. Foi realizado nestas linhagens a pesquisa de genes codificadores de carbapenemases $bla_{KPC,}$ bla_{OXA-48} e $bla_{NDM.}$ Nestes dois casos de suspeita da presença de carbapenemases os testes fenotípicos realizados mostraram-se ser um bom método de triagem, mesmo em linhagens sensíveis a imipenem e meropenem.

Seguindo os critérios da nota técnica da ANVISA ou o CLSI 2011, os BGN, são consideradas possíveis produtoras de carbapenemase, as linhagens que apresentam resistência a carbapenêmicos, entretando neste estudo tivemos a presença de uma linhagem, que foi detectado o gene bla_{VIM-1} e foi considerada sensível ao imipenem e meropenem. Em casos, laboratorialmente pode ocorrer problemas na detecção da produção de carbapenemases utilizando somente a interpretação da categoria dos carbapenêmicos e consequentemente não sendo realizado inicialmente o teste fenotípico, que conduziria a resultados incompletos, podendo ocorrer falha terapêutica.

As bactérias produtoras de MBLs tem sido reportadas como importante causa de infecção hospitalar. O aparecimento das MBLs e sua disseminação entre as bactérias são

questões de grande importância no que diz respeito ao futuro da terapêutica antimicrobiana. A detecção precoce desses genes pode contribuir para o controle de disseminação de isolados MDR. Métodos fenotípicos de triagem (MBLs), apesar de simples de executar, tem mostrado resultados discordantes dependendo da metodologia utilizada, dos ANTs aplicados como substratos, dos inibidores de MBLs utilizados e das bactérias testadas. Os testes fenotípicos devem ser baseados no gênero bacteriano a ser testado, independente de qual enzima é produzida por estes isolados (Picão *et al.,* 2008).

No presente estudo, em uma linhagem de *K. pneumoniae* ESBL positiva (Kp161), que carreava o gene bla_{TEM} apesar de sensível aos 3 carbapenêmicos testados com CIMs baixas para imipenem e meropenem (≤1 e ≤0,25 µg/mL), foi realizado o teste presuntivo para MBL, dando resultado positivo com o disco de ceftazidima (resistente no teste de susceptibilidade). Estes testes foram realizados porque o paciente não apresentava melhora clinica com uso prolongado de meropenem. Apesar de se mostrar sensível a ertapenem, dados da literatura têm demonstrado que o ertapenem não tem se apresentado como bom marcador para amostras produtoras de carbapenemases. Este fato ocorreu porque cepas produtoras de cefotaximases (e outras ESBLs) podem apresentar simultaneamente perda de porinas e outros mecanismos de resistência. Dessa forma, essas cepas podem ser falsamente detectadas como produtoras de carbapenemases, pelos testes fenotípicos (Anvisa, 2010), por isto resolvemos fazer a detecção de genes de resistência por PCR para confirmação. O teste genotípico deu negativo para os genes $bla_{KPC,}$ $bla_{IMP1,}$ $bla_{IMP2,}$ $bla_{IMP4,}$ $bla_{VIM1,}$ $bla_{VIM2,}$ $bla_{OXA-48,}$ e $bla_{NDM.}$ Neste caso, provavelmente houve limitação no teste presuntivo para MBL, levando a um resultado falso positivo.

Assim, de acordo com os resultados obtidos no presente estudo, é possível que na *K. pneumoniae* (Kp161), tenham outras carbapanemases que não foram investigadas, ou provavelmente que o resultado fenotípico para MBLs, encontrado seja falso positivo podendo esta linhagem ter sido inibida *in vitro* pelos inibidores usados no teste (EDTA ou MPA).

A utilização do EDTA tem sido discutida por possuir efeito de permeabilidade da membrana bacteriana, aumentando a sensibilidade a vários ANTs, gerando resultado falso positivo. O MPA, sozinho pode produzir grandes halos de inibição (Picão *et al*., 2008). Também tem sido documentada linhagem de *K pneumoniae* carreando diferentes genes, fazendo associação de diferentes classes de enzimas, como a classe D (OXA-48), classe A *extended-spectrum β-lactamase* (CTX-M-15) e classe C *cephalosporinase* (CMY-16), mostrando a gravidade da situação, criando linhagens extremamente resistentes (Seiffert *et al.,* 2014).Também foi documentada a introdução de KPC-2 e NDM-1 em *E.coli* em Taiwan, que requer monitorização adicional à epidemiologia evitando clones epidémicos em potencial (Ma *et al.,* 2013).

No laboratório de microbiologia clínica é um desafio a suspeita de produção de OXA-48, não somente em *K. pneumoniae,* mas em diversas espécies de enterobactérias já descritas, porque as bactérias produtoras da enzima OXA-48, podem apresentar diferentes padrões de resistência aos beta-lactâmicos, com algumas amostras suscetíveis a cefalosporinas de amplo espectro e carbapenêmicos, outras suscetíveis às cefalosporinas de amplo espectro e resistente aos carbapenêmicos e algumas são resistentes às cefalosporinas de amplo espectro e carbapenêmicos (Poirel *et al.,* 2012; Potron *et al*., 2013).

Além disto, enzimas desta família, geralmente, não são inibidas por inibidores de beta-lactamases (Poirel *et al.,* 2010), dificultando o seu reconhecimento, se tornando uma das preocupações para controlar a disseminação de genes de resistência, a ausência de testes fenotípicos que poderiam contribuir para o seu fácil reconhecimento. Assim, a prevalência destas enzimas pode estar sendo subestimada.

A metodologia "padrão-ouro" para detecção do gene *bla* $_{\text{OXA-48,}}$ é a reação de PCR, apesar disto ela pode não ser capaz de diferenciar as sete variantes alélicas de OXA-48 já descritas, que se diferenciam por apresentar algumas substituições ou deleções de aminoácidos (Poirel *et al.,* 2012, Sampaio *et al.,* 2014), sendo necessário realizar o sequenciamento para diferenciação das variantes (Hanson *et al.,* 2010). Apesar das sequências nucleotídicas serem muito similares, estas enzimas podem apresentar diferentes perfis de hidrólise dos beta-lactâmicos.

Um estudo na área Mediterrâneo, período de 2001 a 2011, mostrando que *Enterobacteriaceae* produtoras de OXA-48 (n=107), são emergentes e representam um grande perigo. Em 91.6%, se apresentaram como intermediário ou resistente a ertapenem, entretanto 66% permaneciam sensíveis a imipenem. Foi observado que 62,6% das amostras produtoras de OXA-48 pertenciam a espécie *K. pneumoniae* (Potron *et al.,* 2013).

Segundo o estudo de Girlich e colaboradores, o teste de Hodge modificado apresenta uma boa sensibilidade para detecção de OXA-48. Por este motivo, a pesquisa de OXA-48, também foi realizado na *K. pneumoniae* (Kp180), que apresentou positivo o teste de Hodge. Esta linhagem não foi produtora da OXA-48, sendo produtora da enzima KPC (Girlich *et al.,* 2012).

A propagação global e aumento da incidência de enterobactérias resistentes a carbapenêmicos, resultam em grandes preocupações na área da saúde pública em todo mundo. No presente estudo podemos observar que o teste presuntivo pode auxiliar na detecção destas enzimas mesmo em linhagens bacterianas que não apresentam resistência plena.

No presente trabalho, apenas 3% de BGN-F tivemos a presença de carbapenemases do tipo KPC (n=1) e VIM (n=1) em *K. pneumoniae.*

Pelo PFGE observamos que em *E. coli,* foi observado um alto grau de polimorfismo genético, identificando um total de 10 grupos clonais, não havendo nenhum perfil prevalente. O mesmo aconteceu para *K. pneumoniae*, apresentando 21 perfis, porém a análise permitiu identificar 5 grupos clonais caracterizados com similaridade mínima de 80% circulando entre diferentes setores do hospital. Três grupos clonais, não foram linhagens produtoras de ESBLs. Em dois grupos clonais houve discordância da presença dos genes codificadores de ESBLs que se apresentaram em associação ou não foram detectados pelo PCR, com o teste fenotípico positivo. Apesar destas diferenças, estas linhagens são possivelmente originadas de um ancestral comum. Algumas linhagens podem perder o gene codificador de ESBL, durante o processo evolutivo, o que explicaria a existência de linhagens produtores e não produtoras de ESBL com mesmo perfil clonal.

Vale lembrar que este presente trabalho envolve bactérias isoladas de sangue. No HUCAM, as enterobactérias produtoras de carbapenemases pelo teste fenotípico, são isoladas em maior número de cultura de diversos materiais clínicos, a maioria provenientes de colonização e não infecção. No HUCAM, as medidas de prevenção são imediatamente tomadas para evitar a disseminação, baseado no documento expedido pela secretaria de saúde do Distrito Federal (NT01/2010), com orientações sobre o manejo de surtos de bactérias multiresistentes, com protocolos de detecção desse mecanismo de resistência e cuidados com o paciente (Distrito Federal, 2011), o que pode justificar o número baixo de isolados em nossa instituição.

O *Staphylococcus aureus* é um CGP encontrado no ambiente externo e também colonizando vários sítios nos seres humanos, que quando predisposto por vários fatores, pode ocorrer invasão microbiana, levando a infecções fatais. *S. aureus* é uma das principais causas de infecções hospitalares e comunitárias, permanecendo como o mais importante patógeno isolado em muitos países (Deurenberg e Stobberingh, 2008). A grande variedade de genes de virulência confere a esses patógenos uma vantagem sobre as defesas do hospedeiro, sendo um fator agravante nas infecções (Zecconi e Scali, 2013), tornando este microrganismo responsável por altas taxas de morbidade e mortalidade em hospitais (Yaw *et al.,* 2014).

No Brasil, *S. aureus* é um dos patógenos mais comumente isolados em infecções nosocomiais de diversos sítios de infecção (Rosenthal *et al.,* 2008). Schuenck e colaboradores observaram que houve uma mudança na epidemiologia do MRSA, com a emergência de novos clones em infecções de MRSA que não apresentavam MDR (Schuenck *et al.,* 2009; Schuenck *et al.,* 2012; Gelatti *et al.,* 2013). O *S. aureus* possui uma notável habilidade de adquirir resistência antimicrobiana, sendo a resistência à meticilina um problema de saúde pública crescente. No Brasil, o MRSA, vem se tornando importante

também fora do ambiente hospitalar, apresentando quadros de intensa gravidade (Rozenbaum *et al.,* 2009; Caraciolo *et al.,* 2012).

Em um estudo realizado em um Hospital Universitário de Goiás, entre 2000 e 2001, 40% das bacteremias foram causadas por este patógeno sendo 55,9% MRSA (Guilarde *et al.,* 2007). Em outro estudo, envolvendo diferentes hospitais do Distrito Federal, foi demonstrada uma prevalência de 35% de *S. aureus* em ICS associada a cateter no CTI (Mesiano e Merchán-Hamann, 2007).

Neste presente estudo, as linhagens bacterianas analisadas (n=88), os perfis de susceptibilidade ao ANT de primeira escolha, para o tratamento em pacientes internados, mostraram uma taxa de resistência de 44% a oxacilina. Foi realizado a reação de PCR para a pesquisa do gene *mecA.* Dos 39 MRSA analisadas, 4 não apresentaram o gene *mecA,* apesar de serem resistentes a oxacilina pelo método fenotípico.

Nestas quatro linhagens seria recomendado o emprego de outras técnicas moleculares, para caracterizar melhor esses isolados, que não foram realizadas porque não fazia parte dos objetivos deste trabalho. Podemos levantar a hipótese que estes isolados apresentem outros mecanismos de resistência à meticilina (oxacilina), tais como: hiperprodução de beta-lactamase ou modificações nas proteínas de ligação da penicilina (PBPs). Esses mecanismos são menos frequentes e conferem resistência a oxacilina não relacionada à presença do gene *mecA,* a resistência *borderline* em que os valores das CIMs de oxacilina estão próximos aos pontos de corte. Os isolados que apresentam esses mecanismos são conhecidos como BORSA (Borderline Oxacillin-Resistant *S. aureus*) (Tomasz *et al*., 1989; Nadarajah *et al.* 2006). A resistência *borderline,* ou resistência mec-independente, é chamada de falsa resistência, uma vez que infecções provocadas por essas cepas podem ser tratadas com antibióticos beta lactâmicos associados a um inibidor de beta-lactamase (Fluit *et al*.,1990).

Outra hipótese sugerida para o fato de haver amostras resistentes fenotipicamente a meticilina, mas não apresentarem o gene *mecA,* pode ser a presença de um variante do gene *mecA,* denominado *mecC.* Este homólogo do gene *mecA* foi detectado em um estudo realizado por no período de janeiro de 2006 a junho de 2011, a partir da análise de 12.691 isolados de origem humana coletados na Alemanha, onde foi encontrado em 11 destes, um novo tipo de cassete cromossômico, denominado SCC*mec* tipo XI. A cepa foi nomeada MRSA CC130 e apresentava um gene homólogo ao *mecA,* denominado mecALGA251, renomeado recentemente como *mecC* (Ito *et al.* 2012). Outros trabalhos no Reino Unido descrevem a presença de gene *mecC* em casos de mastite bovina e em seres humanos (Shore *et al*., 2011; Garcia-Alvarez *et al.,* 2011).

Em países como a França e a Dinamarca, também foram encontrados linhagens provenientes de humanos com fenótipo de MRSA, não apresentando *mecA* e albergando o

gene *mecC* (Petersen *et al.,* 2013). Esta nova variante tem uma larga distribuição na Europa (Laurent *et al.* 2012). Este homólogo do gene *mecA* não é detectado por PCR com oligonucleotídeos para detecção de *mecA*, sendo necessário PCR específica (Cuny *et al.,* 2011; Romero-Gómez *et al.,* 2013) sendo necessário oligonucleotídeos específicos. Portanto, para uma confirmação mais precisa das amostras deste estudo que apresentaram fenótipo de MRSA e ausência do gene *mecA* será necessária à realização de testes mais específicos, que não faziam parte do nosso objetivo.

No presente estudo, tivemos uma expressiva recuperação de VRE em ICS, representando 45% dos *Enterococcus* spp. O *Enterococcus faecium* VRE liderou com 93% (13/14) e o *Enterococcus gallinarium* com 7% (1/14). Não houve isolamento de *Enterococcus faecalis* VRE.

Neste trabalho, as duas linhagens de *E. gallinarium*, corresponde a uma linhagem única, porque pertenciam ao mesmo paciente, com coletas de sangue com intervalo de uma semana. O resultado positivo para o gene *vanC,* confirmou sua identificação previamente realizada pelo VITEK®2 e testes bioquímicos convencionais, porque a presença do gene *vanC* é constitutivo, neste patógeno. O resultado foi negativo para os genes *vanA* e *vanB.* A realização dos testes genotípicos foi importante, visto que o *E. gallinarium*, além de não ser um patógeno comumente recuperado de hemoculturas, é intrinsicamente resistente a vancomicina com valores de CIMs baixas para vancomicina (2-32 µg/mL) e sensível a outro glicopeptídeo como a teicoplanina (0.5-1 µg/mL) (Koneman *et al*., 2008), podendo não ser detectado ou identificado erroneamente na rotina microbiológica, por requerer testes bioquímicos específicos, levando dias para a conclusão da leitura. A inclusão destas duas linhagens na realização dos testes genotípicos comprovou a eficácia das metodologias usadas no HUCAM.

O uso de terapia previa com vancomicina pode ser um fator que predispõe o paciente a ser infectado com VRE. Kaplan e colaboradores descreveram *E. gallinarium,* em paciente submetido a hemodiálise, que desenvolveu ferida e subsequentemente bacteremia. Tinha recebido vancomicina como terapia prévia (Kaplan *et al.,* 1988).

Nos *E. faecium* VRE a resistência foi elevada (100%), para os ANTs testados rotineiramente (ampicilina; ciprofloxacina, clindamicina; eritromicina; penicilina e teicoplanina). A estreptomicina *high-level*, também teve expressiva resistência (93%). Apenas linezolida foi 100% sensível e gentamicina *high- level* 93%. Isto representa a preocupação de infecções com VRE, devido as pouquíssimas opções de tratamento, além do provável risco de transferência do gene *vanA* para o gênero *Staphylococcus* sensível a vancomicina durante a antibioticoterapia (Rossi *et al.,* 2014).

O surgimento de resistência associado à aquisição de elementos genéticos móveis é menos prevalente que a mutação de um gene, pois isto depende de um escape randômico

dos genes do elemento móvel de uma bactéria para outra. Contudo, uma vez que este tipo de resistência tenha ocorrido, esta bactéria pode se disseminar entre os pacientes, como também só o mecanismo de resistência, pode se disseminar entre diferentes gêneros de bactérias (Livermore, 2002).

Os *E. gallinarium,* só apresentaram resistência a clindamicina. A vancomicina apresentou níveis baixos, em pelas duas metodologias: CIM de 2 (VITEK®2) e 3 µg/mL no E-test®). As baixas CIMs apresentadas para vancomicina pode não caracterizar um VRE e representam um perigo caso a identificação do patógeno não seja realizada corretamente, visto que o CLSI 2011, até os dias atuais preconiza sensibilidade a vancomicina com CIMs de ≤4 µg/mL.

Foram demonstrados em um trabalho os níveis baixos de resistência a vancomicina para *E. gallinarium,* sendo considerados moderadamente resistentes vancomicina (CIMs 8-16 µg/mL), mostrando que o mecanismo de resistência pode não ser muito eficiente e as propriedades de cada glicopeptídeos pode desempenhar diferentes atividades (Vincent *et al.,* 1992). Neste presente estudo, de um modo geral, as diferenças na resistência aos ANTs que encontramos, comparadas com outras investigações realizadas em outras partes do mundo, provavelmente seja devido as diferenças na complexidade dos pacientes, a utilização de ANTs, assim como na qualidade dos programas de controle de infecção ou de infra-estrutura dos sistemas de saúde pública.

Os enterococos resistentes a glicopetídeos têm sido descritos em *E. faecium, E. faecalis, E. casseliflavus* e *E. gallinarum.* Os 3 fenótipos de resistência a vancomicina, *vanA, vanB* e *vanC* , tem sido descrito baseado no nível de indução de resistência a vancomicina e teicoplanina. O *vanA* induz alta resistência a todos os glicopeptídeos testados (CIM ≥256 µg/mL), o mesmo não acontecendo com *vanB,* que também mostra indução de resistência a vancomicina , mas permanecem sensíveis a teicoplanina (CIMs 0.5-1 µg/mL) (Shiaes *et al.,*1989). O fenótipo de v*anC* apresenta sensibilidade a teicoplanina (CIMs 0.5-1 µg/mL) e é característico dos VRE móveis.

Foi realizado a pesquisa por PCR dos genes v*anA, vanB e vanC* para os enterococos (n=14). O resultado foi 100% positivo para o gene *vanA* nas linhagens de *E. faecium.* Os *E. gallinarium* apresentaram resultado positivo para o gene *vanC* e resultado negativo para os genes *vanA* e *vanB.* Não foi observado associação entre estes genes. As CIMs dos *E. faecium ,* foram elevadas para vancomicina (≥256 µg/mL) em 100% dos casos, tanto pelo sistema VITEK®2 e pelo teste E-test®, confirmando a presença do gene *vanA,* que apresentam elevadas CIMs (64 a ≥1000 µg/mL). O gene *vanB,* não encontrado, também podem apresentar CIMs elevadas, variando de 4 a ≥1000 µg/m. Estes genes podem estar localizados no cromossoma bacteriano ou em plasmídeos (Koneman *et al*., 2008).

Os fundamentos da técnica de MALDI-TOF MS são a desabsorção/ ionização de moléculas orgânicas intermediadas por uma matriz química. O que diz respeito à análise de rotina, o uso do MALDI-TOF MS apresenta vantagens sobre o teste genotípico PCR, por ser um método rápido, prático e de baixo custo laboratorial, partindo da aplicação direta da colônia em placa de cultivo, podendo ser analizadas vários microrganismos ao mesmo tempo, em poucos minutos (Santos *et al.,* 2010).

No presente estudo, 282 linhagens bacterianas foram pesquisadas usando a tecnologia por MALDI-TOF MS e obtivemos 96% das linhagens bacterianas (270/282) identificadas com elevado índice de similaridade espectral. Estas identificações estão em concordância com os resultados fornecidos pelo sistema VITEK®2 e testes convencionais, realizados no laboratório de microbiologia clínica de rotina do HUCAM. Em 4% (12/282), não tiveram suas identificações concluídas ou foram identificações contraditórias quando comparadas com os resultados do VITEK®2 e testes fenotípicos convencionais. No presente estudo, 4% (12/282), compreendem linhagens que não tiveram suas identificações concluídas (n=8) como: *A. baumannii* (n=3), *P. aeruginosa* (n=2), *E.coli* (n=1), *S. epidermidis* (n=1) *e S. aureus* (n=1). Em 4 linhagens houve identificações discordantes em relação aos resultados prévios obtidos pelo VITEK®2 (*K. pneumoniae* (n=2), *P. aeruginosa* (n=1) e *S. epidermidis* (n=1).

As identificações não realizadas por MALDI-TOF MS, pode ter ocorrido pela dificuldade de lise da parede celular de alguns patógenos, devido a sua complexidade ou constituintes. Outra hipótese pode ter sido devido a falta de linhagens de referência no data base do sistema, visto a grande diversidade genética que existe entre os patógenos em todo o mundo, que dependendo das condições climáticas ou pressão antimicrobiana podem deixar de produzir alguma proteína. Em relação as identificações discordantes realizadas pelo MALDI-TOF MS, com elevado índice de similaridade espectral, pode caracterizar contaminação na amostra. Por estas linhagens terem sido transportadas para outro país para realização da identificação por MALDI-TOF MS, tal fato pode ter ocorrido. Estas linhagens (n=4), não foram reenviadas para reavaliação.

Neste estudo, a *A. baumannii,* foi o patógeno que apresentou o maior problema na identificação pelo MALDI-TOF MS (n=3). O gênero *Acinetobacter*, apresenta bom crescimento nos meios de cultura utilizados em um laboratório de rotina e a identificação é composta de provas bioquímicas simples, realizadas em paralelo com a automação, para confirmação da identificação do gênero. Entretanto, a identificação das espécies envolvidas no complexo *A. baumannii,* requer testes moleculares. Em um trabalho, Lee e colaboradores, descrevem o sequenciamento de gene rpoB e do 16S rRNA, como ferramentas utilizadas na identificação das espécies de *Acinetobacter* e quando comparados com o sistema VITEK®2 as taxas de acurácia foram 98.2%, 93.4% e 35.9%,

respectivamente (Lee *et al,* 2014). Portanto podemos ter falhas até mesmo com o sistema automatizado.

Neste presente trabalho, as características das três *A. baumannii*, que foram identificadas pelo VITEK®2 e não identificadas pelo MALDI-TOF MS foram: resistência a diferentes classes de antimicrobianos (MDR) e na reação de PCR apresentaram a presença do gene $bla_{OXA-23,}$ que é o principal gene envolvido na resistência a carbapenêmicos neste gênero e o gene $bla_{OXA-51,}$ que é encontrado em *A. baumannii*. No PFGE, estas linhagens, não pertencem a um grupo clonal.

Segundo Alvarez e colaboradores, o MALDI-TOF MS, pode ser útil para identificar o gênero *Acinetobacter*, mas não as espécies do gênero, sendo ainda necessárias técnicas moleculares para diferenciar as espécies (Alvarez-Buylla *et al.,* 2012). Em contraste, no mesmo ano, autores mostram que usando MALDI-TOF MS, podemos ter correta identificação do complexo *A. baumannii,* que são difíceis de serem identificadas por testes fenotípicos. A identificação incorreta em apenas uma espécie, foi devido a falta de linhagens de referência no data base do sistema, que quando adicionado, obteve a identificação correta (Espinal *et al*., 2012), o que também pode ter ocorrido em nosso estudo. De acordo com este trabalho, outros autores concluiram que MALDI-TOF MS, pode ser usado como um método rápido e confiável para identificar espécies do complexo *A baumannii* onde apresentou identificação correta em 98.6% (142/144) de *A. baumannii*, 72.4% (63/87) de *A. nosocomialis* e 97.6% (41/42) de *A. pittii.* As demais espécies como *Acinetobacter junii, A. ursingii, A. johnsonii* e *A. radioresistens* (n=28), também podem ser identificadas corretamente (Hsueh *et al*, 2014).

Em relação a *P. aeruginosa* (n=2), identificadas pelo VITEK®2 e não identificadas pelo MALDI-TOF MS, também foram resistentes a carbapenêmicos e uma foi MDR. Estas linhagens bacterianas, não apresentam dificuldades na sua identificação em um laboratório clínico de rotina. Na cultura podem ser observados aspectos característicos como a produção de pigmento azul (piocianina) e/ou esverdeado fluorescente (pioverdina). Este pigmento azul-esverdeado se difunde no meio, conferindo ao meio de cultura, uma coloração característica. Estas características fenotípicas básicas, confirmam a identificação do VITEK®2. Porém, estas linhagens podem apresentar mucosidade na colônia bacteriana, devido a presença de alginato que é um material semelhante a um polissacarídeo (exopolissacarideo), formando uma cápsula proeminente na superfície da *P. aeruginosa*, protegendo da fagocitose e reduzindo significativamente a capacidade de penetração de agentes como ANTs e outros compostos (Koneman et al., 2008). Este pode ter sido um dos motivos da dificuldade de lise da parede celular e consequentemente a não identificação pelo MALDI-TOF MS.

Autores alegam que a falta de identificação por MALDI-TOF MS, em alguns BGN-NF é devido a falta de informacões no banco de dados do sistema utilizado, que é baseado na massa molecular protéica produzindo um *fingerprint*, correspondendo a uma massa espectral específica para cada microrganismo (Fernández-Olmos, 2011).

No presente estudo, em relação as linhagens de CGP, *S. epidermidis* (n=1) *e S. aureus* (n=1), identificadas pelo VITEK®2 e não identificadas pelo MALDI-TOF MS, a identificação laboratorial destes cocos não é uma tarefa difícil, porque provas simples e rápidas podem diferenciar os dois gêneros, como a prova da catalase. As características fenotípicas do crescimento em meios de cultura também ajudam. Porém, a identificação da espécie pode ser um problema para o *S. epidermidis*, ficando na dependência do sistema automatizado, porque requer várias provas bioquímicas adicionais, não disponível em um laboratório clínico de rotina. Entretanto o mesmo não ocorre em *S. aureus*. Provas simples e rápidas podem identificar esta bactéria, como a coagulase. Os dois CGP, apresentaram diferentes perfis de resistência. O *S. epidermidis* foi resistente a oxacilina e o *S. aureus* foi sensível a oxacilina. Portanto acredita-se que a aquisição do provável gene de resistência o *mecA,* não foi o motivo de não ter sido identificado por MALDI-TOF MS, mas sim a dificuldade de lise celular, provavelmente devido a rigidez da sua parede celular, constituída pela grossa camada de glicopeptídeos e os ácidos teicóicos (Koneman *et al.,* 2008).

Dubois e colaboradores em um estudo com 152 linhagens de *Staphylococcus,* compreendendo 22 diferentes espécies, concluíram que o MALDI-TOF MS, identificou corretamente 99.3% das espécies e em apenas uma foi identificado só o gênero. A tecnologia MALDI-TOF MS revelou diferentes grupos clonais de *S. epidermidis* originadas dos seres humanos ou meio ambiente, sugerindo que quando associado a um largo espectro no banco de dados é uma ferramenta confiável e rápida na identificação de *Staphylococcus* spp. (Dubois *et al,* 2010).

Em um outro estudo recente, os resultados do MALDI-TOF MS, quando comparados ao método de referência (PCR) , teve concordância em 96.6% de identificação do gênero e espécie para *Staphylococcus* coagulase-negativa e 100% para *S. aureus.* As linhagens bacterianas foram recuperadas diretamente do frasco de hemocultura positiva, mostrando um grande avanço no diagnóstico clínico (Kilic e Baysallar, 2014). Outro trabalho realizado, os autores mostram que o MALDI-TOF MS, apresentou grande confiabilidade na identificação dos CGP. Um total de 156 CGP, representados pelos gêneros mais clinicamente importantes como *Staphylococcus*, *Aerococcus, Enterococcus, Streptococcus* e os mais raros como *Gemella* e *Granulicatella,* a taxa de identificação correta do gênero foi de aproximadamente 99%, usando três métodos diferentes de preparação da amostra. Numa análise retrospectiva com 1619 isolados clínicos de CGP, analisados na rotina pelo MALDI-TOF MS e testes bioquímicos convencionais, obteve-se 95.6% de concordância

entre as metodologias. As duas maiores limitações foi para diferentes espécies de *Streptococcus grupo mitis* e de *Streptococcus dysgalactiae* (Schulthess *et al,* 2013).

Inúmeros estudos foram desenvolvidos nos últimos anos demonstrando a efetividade da técnica MALDI-TOF na rápida identificação bacteriana e fúngica (Santos e Lima, 2010a e 2010b; Bizzini *et al.,* 2010; Santos *et al.,* 2011; Pereira *et al.,* 2010; Veloo *et al.,* 2011, Ratcliffe *et al*., 2013, Angelakis e Raoult, 2014). Outros protocolos foram desenvolvidos para identificar patógenos presentes em hemocultura, a partir de aplicação da espectrometria de massa diretamente nos frascos de hemoculturas, dos sistemas automatizados, quando detectados positivos (Stevenson *et al.,* 2010; Romero-Gómez *et al.,* 2012; Vlek *et al.,* 2012; Kilic e Baysallar, 2014; Hoyos-Mallecot *et al.,* 2014), reduzindo o tempo para liberação do laudo laboratorial em 34.3 horas ($P < 0.0001$) (Lagacé-Wiens *et al.,* 2012). Além disto, há o desenvolvimento de estudos proteômicos para a identificação de fenótipos de mecanismos de resistência, mostrando também ser uma ferramenta relevante e abrindo novos caminhos tanto na microbiologia clínica quanto experimental (Edwards-Jones *et al.,* 2000; Lee *at al*., 2013; Wang *et al.,* 2013, Hrabák *et al.,* 2013).

Nos últimos anos a metodologia MALDI-TOF MS, tem emergido como uma técnica promissora e confiável na identificação de patógenos. Em um estudo comparativo entre diferentes metodologias (MALDI-TOF MS, VITEK®2 e sequenciamento genético), obteve-se resultados consistentes com MALDI-TOF MS, com menos custos e dez vezes mais rápido. entre as metodologias, quando analizou 73 enteropatógenos (Deng *et al.,* 2014). Outro estudo recente, mostrou-se também eficaz quando comparado com o método fenotípico, na identificação de 333 Bacilos Gram-Positivos (BGP) incluindo 22 gêneros e 60 espécies. A identificação das espécies dos BGP, foi de 92,49% pelo MALDI-TOFMS, comparado com 85,89% pelo método fenotípico (Barberis *et al.,* 2014). As identificações de BGP em um laboratório clínico de rotina são problemáticas e requer além de *expertises,* muitas provas adicionais com longo períodos de incubação dos testes, nem sempre conclusiva.

Os dados do presente estudo, foram compatíveis com outro estudo, comparando a precisão da técnica de MALDI-TOF MS, com a técnica de referência em identificação de enterobactérias, o sequenciamento do 16S rRNA. As enterobactérias foram corretamente identificadas em 96.7% (n=965) com 83.8% espécies corretas e 12.8% limitado a identificação do gênero. Apenas em 1.7% dos isolados, não teve identificação e 0.7 % (n=7) tiveram identificações errôneas, com gênero diferente do achado pela técnica molecular (Richter *et al,* 2013).

O Sistema MALDI-TOF MS pode fornecer a identificação do gênero e espécie de diferentes grupos de bactérias. A implementação desta tecnologia nos laboratórios clínicos pode providenciar resultado em um período de tempo relevante menor do que os sistemas de identificação bioquímica comerciais atuais.

Em conclusão, para alguns patógenos os sistemas automatizados podem falhar principalmente na identificação de microrganismo, geralmente BGN-NF e CGP fastidiosos, incomumente isolados no laboratório clínico de rotina, que muitas vezes não dispõe de inúmeras provas bioquímicas específicas, necessárias para identificação da maioria das espécies, além de que, muitas destas provas requerem muitos dias de incubação para a identificação final, levando a demora da liberação do laudo final, que é primordial no ajuste da terapia empírica prévia. Em alguns casos o sistema automatizado pode liberar CIMs baixas de ANTS, sendo necessário utilizar provas bioquímicas adicionais, para a confirmação da identificação do patógeno (ex: *E. gallinarium).* De contra partida*,* o sistema pode auxiliar liberando informações sobre a possibilidade de genes raros (ex; gene *mecC* em *S. aureus).*

Com a emergência de novos genes de resistência encontrados, é contemporâneo e necessário, que métodos mais rápidos de identificação bacteriana como o de MALDI-TOF MS, sejam incluídos em um laboratório de microbiologia clínica de rotina, porque uma vez conhecido a epidemiologia local, esta identificação rápida e acurada pode levar a uma terapia empírica rápida e eficiente, ajudando a diminuir taxas de mortalidade. Além disto, a CCIH poderá tomar medidas prévias para evitar a disseminação do provável patógeno MDR, até a liberação final do TSA, liberado somente 18-24h após o crescimento puro do patógeno.

A resistência antimicrobiana é um problema emergente na medicina humana que está exigindo mudanças na terapia empírica para várias infecções. Programas de monitoramento de resistência aos ANTs e uma constante atualização dos procedimentos utilizados para avaliação de fenótipos de resistência, são importantes neste momento critico, pela velocidade na qual se desenvolvem os microrganismos MDR. O uso racional e criterioso dos ANTs é essencial a fim de prevenir o desenvolvimento e a disseminação destes microrganismos. Neste momento crucial é de extrema urgência a identificação rápida do patógeno.

Nos últimos anos têm-se vindo a confirmar um renovado interesse nas coleções biológicas como fontes de pesquisa nas mais diversas áreas teóricas e aplicadas, desde estudos de biodiversidade, conservação e gestão de ecossistemas, medicina, farmacologia, entre muitas outras. O HUCAM cumpre a função de hospital-escola, atuando na formação direta de médicos e enfermeiras e indiretamente, de outros profissionais. Com o aumento do isolamento de bactérias MDR, a mudança no perfil de susceptibilidade das linhagens bacterianas isoladas e o interesse constante de pesquisa destes patógenos, foi nosso objetivo criar uma Coleção de Culturas de Bactérias de Referência do HUCAM denominada CCBR-HUCAM para mater as linhagens de bactérias multiresistentes isoladas nas análises de rotina.

A primeira coleção que se tem registro é a Coleção Kral, estabelecida em Praga, em 1890, com a finalidade de fornecer culturas puras para estudos comparativos e identificação de bactérias patogênicas. No início do século 20, outras coleções foram estabelecidas na Europa, Estados Unidos e Japão, com a finalidade básica de conservar e fornecer material de referência para estudos taxonômicos. Estas coleções passaram por um contínuo processo de evolução, visando atender demandas especializadas decorrentes dos avanços na microbiologia industrial (década de 1960), biotecnologia (década de 1980) e engenharia genética e genômica (década de 1990) (Canhos, 2003).

As coleções de culturas são centros de conservação que tem a função de coletar organismos relevantes para estudos científicos e aplicações tecnológicas, tornando-os disponíveis para usuários interessados. A maneira mais eficiente de conservar microrganismos de importância econômica é a preservação em coleções. A preservação e manutenção das culturas devem ser feitas de forma a garantir sua sobrevivência, estabilidade e pureza durante períodos prolongados de tempo, conservando características genéticas e propriedades morfo/fisiológicas (Abreu e Tutunji, 2004).

Neste contexto, a CCBR-HUCAM, foi estabelecida em Vitória, ES, Brasil, inicialmente com o acervo de bactérias, isoladas de hemocultura no ano 2011, com a missão de preservar a memória epidemiológica de patógenos de importância regional. As bactérias pertencentes a esta coleção foram bem identificadas por diferentes técnicas metodológicas, como apresentado e discutido anteriormente.

A meta é garantir as condições para que os serviços e informações associadas a coleção, que serão disponibilizadas pela CCBR-HUCAM à rede de vigilância epidemiológica e acadêmica, sejam de excelente qualidade. Para isso os procedimentos foram padronizados com foco principal na gestão da qualidade e de dados desta coleção.

Com este presente estudo, compreendendo uma vasta variedade de gêneros e espécies bacterianas, isoladas de sangue de pacientes, com diferentes patologias, em uso ou não de diferentes grupos de ANTs, também podemos realizar estudos comparativos entre diferentes regiões do nosso país e até mesmo de outros países, além de promover a formação de pessoal na operação de coleções de culturas, criando competência para novos desafios. Até o momento, pelo nosso conhecimento, a CCBR-HUCAM é a primeira coleção de cultura de nosso estado estando disponibilizada para atendimento sob solicitação de outros pesquisadores, para fins didáticos e para estudos comparativos, servindo como fonte de estudo e pesquisa para profissionais da área da saúde, subsidiando direta e integralmente a elaboração de trabalhos de conclusão de curso de graduação, dissertações de mestrado e teses de doutorado.

Capítulo 5. Conclusões

A presente tese teve como objetivo principal, obter um acervo de bactérias de referência, formada por diferentes gêneros e espécies. Em 282 linhagens bacterianas isoladas de infecções de corrente sanguínea, foram obtidas 12% de *Klebsiella pneumoniae,* 12% de *Escherichia coli,* 8% de *Acinetobacter baumannii*, 7% de *Pseudomonas aeruginosa,* 30% de *Staphylococcus aureus,* 20% de *Staphylococcus epidermidis* e 11% de *Enterococcus* spp. Todos as linhagens foram identificadas, caracterizadas e preservadas em uma coleção de culturas estabelecida no HUCAM para este efeito.

Através da técnica por MALDI-TOF MS, foram identificados 96% dos 282 patógenos, apresentando boa correlação com as metodologias previamente empregadas, nomeadamente, o sistema automatizado VITEK®2 e os testes bioquímicos convencionais. Isto demonstra a eficácia do MALDI-TOF MS, que representa um grande avanço na área da microbiologia clínica, sendo uma técnica rápida, confiável e com baixo custo.

Pela inclusão do TSA, foi possível observar a elevada frequência de resistência a carbapenêmicos, encontrada para 55% das *A. baumannii*. A resistência a vancomicina em 45% dos enterococos (*E. faecium* e *E. gallinarium*), a resistência a oxacilina em 57% dos *S. epidermidis* e *S.aureus com* 44% de MRSA. Além disto, 51% das *K. pneumoniae* apresentou teste positivo para ESBL. Os menores índices de resistência a antimicrobianos foram encontrados para *P. aeruginosa* MDR e *E. coli* ESBL, com apenas 21% cada.

Os setores PS, CM e CTI se destacam no isolamento de 80% das linhagens de BGN-F, sendo o PS responsável por 42%, liderando também em relação aos CGP, com 36%. Em relação aos BGN-NF, o CTI lidera com 36%, seguido do PS com 27%. Foram observadas que 50% das linhagens de *K. pneumoniae* ESBL, *P. aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos e *E. faecium* VRE, foram recuperados de pacientes internados no setor do PS. Entretanto, as linhagens de A*. baumannii* MDR, 60% delas foram recuperadas de pacientes no CTI.

Para 90% dos MRSA, observou-se a presença do gene *mecA.* Pode-se levantar a hipótese da presença de outros mecanismos de resistência à oxacilina, menos frequentes, e/ou a presença do gene *mecC,* recentemente descrito, nas linhagens negativas. Os VRE, 100% dos *E. faecium,* apresentaram o gene *vanA,* responsável pelos altos níveis de resistência a vancomicina e para os *E. gallinarium* o gene *vanC.*

Encontrou-se a enzima TEM em 58% dos BGN-F produtores de ESBL, seguida de CTX- M (42%) e SHV (25%). As enzimas TEM e CTX-M foram prevalecentes em *E. coli* (71%), mas apenas 20% das CTX-M, apresentaram a variante alélica $bla_{\text{CTX-M-15}}$. Em *K. pneumoniae* a enzima TEM se destacou com 53% e apenas 29% apresentaram a CTX-M, entretanto com a variante alélica $bla_{\text{CTX-M-15}}$, presente em 80%. A enzima SHV não foi

encontrada em *E. coli.* Em 29% das *K. pneumoniae* ESBL, não apresentaram os genes citados.

Os genes codificadores de carbapenemases investigados, foram encontrados em apenas 3% de BGN-F, sendo enzimas do tipo KPC e VIM detectadas por PCR, em duas *K. pneumoniae.* Em BGN-NF, não foram encontrados diferentes genes (*bla*$_{SPM-1}$, *bla* $_{IMP}$, *bla* $_{VIM1}$, *bla* $_{VIM2}$,*bla*$_{KPC}$ e *bla*$_{NDM}$) em *P. aeruginosa*, com as CIMs altas a carbapenêmicos. No entanto, evidenciamos que em 92% das *A. baumannii* MDR, tivemos a presença da enzima OXA-23. A OXA-58 foi encontrada em 8%.

Os genes de beta-lactamases de espectro estendido, foram encontrados associados ao gene *bla*$_{KPC}$ (enzimas do tipo TEM) e ao gene *bla*$_{VIM}$ (SHV e CTX M-15).

Salienta-se a diversidade genética reconhecida através de PFGE na amostragem realizada de BGN, na qual se registra a disseminação de apenas duas linhagens (um grupo clonal acima de 96% de similaridade) em *A. baumannii,* entre os setores CTI e PS. Em *K. pneumoniae*, observou 5 grupos clonais (similaridade mínima de 80%), circulando entre diferentes setores do hospital (CTI, PS e UTIN). Destes, três grupos clonais, não foram produtores de ESBLs. Em *P. aeruginosa* e *E. coli,* não ocorreu disseminação de clones.

Não encontramos a presença de grupos clonais prevalentes nos gêneros estudados, sugerindo que as linhagens bacterianas não estão envolvidas em surtos no HUCAM. Devido ao nosso estudo, os resultados apresentados nos permite inferir que os métodos de controle de infecções de corrente sanguínea foram eficazes no HUCAM durante o período estudado, baseado na diferença encontrada nos diferentes perfis de fragmentação obtidos através da tipagem molecular, indicando que não houve dispersão clonal no ambiente hospitalar, com posterior aquisição de resistência e disseminação da maioria das linhagens pesquisadas.

Os resultados deste estudo reforçam a importância de técnicas rápidas para a identificação bacteriana, destacando o MALDI-TOF MS, porque se temos conhecimento da epidemiologia local, pode ser inferida uma terapia empírica rápida e eficiente ao paciente, ajudando a diminuir taxas de mortalidade e a emergência de patógenos MDR, com o uso inadequado de antimicrobianos. Paralelamente, evitar disseminação de clones resistentes no ambiente hospitalar e possível propagação para a comunidade.

Em suma, as linhagens bacterianas estudadas no âmbito do presente trabalho, foram preservadas, garantindo sua sobrevivência, estabilidade e pureza, dando início a uma coleção de culturas, pelo estabelecimento da CCBR-HUCAM, que representa um enorme avanço na área de infraestrutura de apoio à pesquisa do HUCAM. A CCBR-HUCAM alberga neste momento uma parte da biodiversidade genética, recorrente dos casos clínicos diagnosticados no HUCAM, sendo uma fonte vital de microrganismos de referência para investigações futuras.

Cápitulo 6. Referências Bibliográficas

1) Ambler, R.P. 1980. The Structure of β-Lactamases. *Biological Sciences*, 289, 1036, 321-331.
2) AB BIODISK 1994. Etest technical guide 4b: antifungal susceptibility testing of yeasts. *AB BIODISK, Piscataway, N.J*.
3) Arakawa, Y., Shibata, N., Shibayama, K., Kurokawa, H., Yagi, T., Fujiwara, H. & Goto, M. 2000. Convenient test for screening metallo-β-lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J. Clin. Microbiol*, 38, 40-43.
4) Abreu, M.M.V. & Tutunji, V.L. 2004. Implantação e manutenção da coleção de cultura de microrganismos do UniCEUB. *Universitas Ciência da Saúde*, 2 (2,), 236-251.
5) Anderson K.F., Lonsway D.R., Rasheed J.K., Biddle J., Jensen B., McDougal L.K., Carey R.B., Thompson A., Stocker S., Limbago B. & Patel J.B. 2007. Evaluation of methods to identify the Klebsiella pneumoniae carbapenemase in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 45(8), 2723-5.
6) Anvisa. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2009. Boletim Informativo da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde-Rede RM. Edição nº 1, de 10 de julho de 2009, Análise de dados: julho de 2006 a junho de 2008. (On line) disponível em: http://www.anvisa.gov.br/divulga/newsletter/rede_rm/2009/100709_perfil_sensibilidade.htm [Acessado em outubro 2014].
7) Anvisa, 2010. Medidas para identificação, prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde por microrganismos multirresistentes. (Online) Disponível em http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/ih/pdf/nota_tecnica2_IH.pdf
8) Alatoom A.A., Cunningham S.A., Ihde S.M., Mandrekar J. & Patel R. 2011. Comparison of direct colony method versus extraction method for identification of gram-positive cocci by use of Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol,* 49(8),2868-73.
9) Alvarez-Buylla A., Culebras E. & Picazo J.J. 2012. Identification of Acinetobacter species: is Bruker biotyper MALDI-TOF MS -TOF mass spectrometry a good alternative to molecular techniques? *Infect Genet Evol*, 12, 345–9.
10) Anastay M, Lagier E, Blanc V. & Chardon H. 2013. Epidemiology of extended spectrum beta-lactamases (ESBL) Enterobacteriaceae in a General Hospital, South of France, 1999-2007. *Pathol Biol (Paris),* 61(2):38-43.
11) Angelakis E. & Raoult D., 2014. Methods for the discovery of emerging pathogens. *Microb Pathog*, 9 pii: S0882-4010(14)00089-8.

12) Anvisa, 2014. Boletim Informativo da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde - Rede RM. Ano IV Edição nº 7 de 10 de março de 2014. (Online) Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br [Acessado em outubro 2014].

13) Brenner, D.J. 1984. Family I Enterobacteriaceae RAHN, 1937, In: Krieg,N.R.;Holt, J.G.(eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. Willians, Wilkins. Baltimore. MD: 964p. 2v. V.1, 408-516.

14) Bush K., Jacoby G.A. & Medeiros A.A.1995. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*, 39(6), 1211-33.

15) Bush, K., 1998. Metallo-ß-lactamases: a class apart. *Clin Infect Dis*, 27 (1), S48-S53.

16) Bush K. & Jacoby GA. 2010. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 54(3), 69-76.

17) Bush K & Fisher JF. 2011. Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new β-lactamases from gram-negative bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 65, 455-78.

18) Bergogne-Bérézin E & Towner KJ.1996. Acinetobacter spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin Microbio*l. 9(2),148-65.

19) Barbuddhe S.B., Maier T., Schwarz G., Kostrzewa M., Hof H., Domann E., Chakraborty T. & Hain T. 2008. Rapid identification and typing of listeria species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol*. 74(17),5402- 7.

20) Bizzini A. & Greub G. 2010. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *Clin Microbiol Infect*, 16(11), 1614-9.

21) Bizzini, A., Durussel, C., Bille, J., Greub, G. & Prod'hom, G. 2010. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory, *J Clin Microbio,* 48(5), 1549-54.

22) Baş, A.Y., Demirel N., Zenciroglu A., Göl N. & Tanir G. 2010. Nosocomial blood stream infections in a neonatal intensive care unit in Ankara, Turkey. *Turk J Pediatr,* 52(5), 464-70.

23) Burckhardt I. & Zimmermann S. 2011. Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. *J Clin Microbiol*, 49(9), 3321-4.

24) Bonnin RA, Poirel L, Naas T, Pirs M, Seme K, Schrenzel J & Nordmann P. 2012. Dissemination of New Delhi metallo-β-lactamase-1-producing Acinetobacter baumannii in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 18(9):E362-5.

25) Bushnell G., Mitrani-Gold F. & Mundy L.M. 2013. Emergence of New Delhi metallo-β-lactamase type 1-producing enterobacteriaceae and non-enterobacteriaceae: global case detection and bacterial surveillance. *Int J Infect Dis.,* 17(5), 325-33.

26) Barberis C., Almuzara M., Join-Lambert O., Ramírez M.S., Famiglietti A. & Vay C. 2014. Comparison of the bruker maldi-tof mass spectrometry system and conventional phenotypic methods for identification of gram-positive rods. *PLoS One.* 9(9), e106303.

27) Cain, T.C., Lubman, D.M. & Webber W.J. Jr. 1994. Differentiation of bacteria using protein profiles from MALDI-TOF-MS. *Rapid Communications in Mass Spectrometr,* 8, 1026-1030.

28) Crowder M.W., Walsh T.R., Banovic L., Pettit M. & Spencer J. 1998. Overexpression, purification, and characterization of the cloned metallo-beta-lactamase L1 from Stenotrophomonas maltophilia. *Antimicrob Agents Chemother.* 42(4), 921-6.

29) Carmeli Y., Hunskins W.C. & Samore M.H. 1999. The association between vancomycin treatment and hospital-acquired vancomycin-resistant enterococci (VRE): a meta-analysis. *Arch Intern Med*,159, 2461-8.

30) Canhos, V. P. 2003. Centros de recursos biológicos: suporte ao desenvolvimento científico e inovação tecnológica, Ciência e Cultura, 55(3), 27-29. Disponível em:<http://www.cria.org.br/cgee/documentos/centros_de_recursos_biologicos.doc>. Acesso em: 28 agosto 2014.

31) Caiaffa Filho H.H., Almeida G.D., Oliveira G.A., Sarahyba L., Mamizuka E.M. & Burattini M.N. 2003. Molecular characterization of van genes found in vancomycin-resistant Enterococcus spp. isolated from the Hospital das Clínicas, FMUSP, São Paulo, Brazil. *Braz J Infect Dis,* 7(3), 173-4.

32) Castanheira, M., Toleman, M.A., Jones, R.N., Schmidt, F.J. & Walsh, T.R. 2004. Molecular characterization of a beta-lactamase gene, *bla*GIM-1, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase, Antimicrob. *Agents Chemother,* 48, 4654-4661.

33) Carvalho A. P., Albano R. M., de Oliveira D. N., Cidade D. A., Teixeira L. M. & Marques E. A. 2006. Characterization of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo-beta-lactamase in a hospital located in Rio de Janeiro, Brazil. *Microb Drug Resist*,.12(2), 103-8.

34) Carvalho-Assef A.P., Pereira P.S., Albano R.M., Berião G.C., Chagas T.P., Timm L.N., Da Silva R.C., Falci D.R. & Asensi M.D. 2013. Isolation of NDM-producing Providencia rettgeri in Brazil. *J Antimicrob Chemother.* 68(12), 2956-7.

35) Carvalho-Assef A.P, Pereira P.S, Albano R.M, Berião G.C, Tavares C.P, Chagas TP, Marques EA, Timm L.N, Da Silva RC, Falci D.R & Asensi M.D. 2014. Detection of NDM-1, CTX-M-15-, and qnrB4-producing Enterobacter hormaechei isolates in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*, 58(4), 2475-6.

36) Carvalho, K.R., Carvalho-Assef, A.P., Peirano, G., Santos, L.C.G.D., Pereira, M.J.F. & Asensi, M.D. 2009. Dissemination of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii genotypes carrying bla (OXA-23) collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 34(1), 25-28.

37) Costa, E.C.; Teixeira, M F.S.; Dantas, T.V.M.; Melo, V.S.P.; Araujo, S. A. C. & Rolim, B.N. 2009. Princípios da estocagem e preservação de amostras microbiológicas (On line). Ciência Animal, Goiânia, 19 (2),.111-122. Disponível em: http://www.uece.br/cienciaanimal/dmdocuments/artigo10_2009 [Acessado outubro 2014].

38) Casey A.L., Worthington T., Lambert P.A. & Elliott T.S. 2007. Evaluation of routine microbiological techniques for establishing the diagnosis of catheter-related bloodstream infection caused by coagulase-negative staphylococci, 56(Pt 2), 172-6.

39) Cipriano R., Vieira V.V., Fonseca E.L., Rangel K., Freitas F.S. & Vicente A.C. 2007. Coexistence of epidemic colistin-only-sensitive clones of Pseudomonas aeruginosa, including the bla_{SPM} clone, spread in hospitals in a Brazilian Amazon City, *Microb Drug Resist*, 13(2), 142-6.

40) Cortés, J.A., Garzón, D.C., Navarrete, J.A. & Contreras, K.M. 2010. Impact of inappropriate antimicrobial therapy on patients with bacteremia in intensive care units and resistance patterns in Latin America, *Rev Argent Microbiol.*, 42(3), 230-4.

41) Cornaglia G, Giamarellou H. & Rossolini G.M. 2011. Metallo-β-lactamases: a last frontier for β-lactams? *Lancet Infect Dis,* 11(5):381-93.

42) Carrër A. & Nordmann P. 2011. CTX-M-15-producing Klebsiella pneumoniae: a change in the epidemiology of ESBL, *Pathol Biol (Paris)*, 59(6),.e133-5.

43) Chagas T.P.G, Seki L.M, da Silva D.M. & Asensi M.D. 2011. Occurrence of KPC-2-producing Klebsiella pneumoniae strains in hospital wastewater. *J Hosp Infect.*, 77(3), 281.

44) Clinical Laboratory Standards Institute. 2011. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing, Document M100–S20, CLSI, Wayne, PA.

45) Cuny C., Layer F., Strommenger B. & Witte W. 2011. Rare occurrence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus CC130 with a novel mecA homologue in humans in Germany, *PLoS One.,* 6(9), e24360.

46) Cai J.C., Hu Y.Y., Zhang R., Zhou H.W. & Chen G.X. 2012. Detection of OmpK36 porin loss in Klebsiella spp. by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*, 50(6), 2179-82.

47) Caraciolo FB., Maciel MA., Santos JB., Rabelo MA. & Magalhães V., 2012. Antimicrobial resistance profile of Staphylococcus aureus isolates obtained from skin

and soft tissue infections of outpatients from a university hospital in Recife -PE, Brazil. *An Bras Dermatol,* 87(6), 857-61.

48) Ciofi Degli Atti M., Bernaschi P., Carletti M., Luzzi I., García-Fernández A., Bertaina A., Sisto A., Locatelli F. & Raponi M. 2014. An outbreak of extremely drug-resistant P aeruginosa in a tertiary care pediatric hospital in Italy. *BMC Infect Dis,* 14(1), 494.

49) Carvalhaes C.G, Cayô R., Visconde M.F, Barone T, Frigatto E.A, Okamoto D, Assis D.M, Juliano L, Machado AM. & Gales A.C. 2014. Detection of carbapenemase activity directly from blood culture vials using MALDI-TOF MS: a quick answer for the right decision. *J Antimicrob Chemother*, 69(8), 2132-6.

50) CABRI 2014. Common access to biological resources information. (On Line). Available at: www.cabri.org (Accessed in October 2014).

51) Defez, C., Fabbro-Peray, P., Bouziges, N., Gouby, A., Mahamat, A., Daures, J.P. & Sotto, A. 2004. Risk factors for multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* nosocomial infection, *J. Hosp. Infect*, 57, 209-216.

52) Depardieu F., Perichon B. & Courvalin P. 2004. Detection of the van alphabet and identification of enterococci and staphylococci at the species level by multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 42(12):5857-60.

53) Dumont F., Marechal P.A. & Gervais P. 2004. Cell size and water permeability as determining factors for cell viability after freezing at different cooling rates. *Appl Environ Microbiol.,* 70(1), 268-72.

54) Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E. 2006. The prokaryotes: Ecophysiology and biochemistry. 3ed. New York, USA: Springer.

55) Deurenberg R.H.. & Stobberingh E.E. 2008. The evolution of Staphylococcus aureus, *Infect Genet Evol,* 8,747-763.

56) Dubois D, Leyssene D., Chacornac J.P., Kostrzewa M., Schmit P.O., Talon R., Bonnet R. .& Delmas J. 2010. Identification of a variety of Staphylococcus species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol,* 48(3), 941-5.

57) Dieckmann R. & Malorny B. 2011. Rapid screening of epidemiologically important Salmonella enterica subsp. enterica serovars by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol,* 77(12), 4136-46.

58) Diekema D.J. & Pfaller M.A. 2013. Rapid detection of antibiotic-resistant organism carriage for infection prevention, *Clin Infect Dis*, 56(11),1614-20.

59) Deng J., Fu L., Wang R., Yu N., Ding X., Jiang L., Fang Y., Jiang C., Lin L., Wang Y. & Che X. 2014. Comparison of MALDI-TOF MS, gene sequencing and the Vitek 2 for

identification of seventy-three clinical isolates of enteropathogens, *J Thorac Dis*, 6(5),.539-44.

60) De Santis V., Gresoiu M., Corona A., Wilson A.P. & Singer M. 2014. Bacteraemia incidence, causative organisms and resistance patterns, antibiotic strategies and outcomes in a single university hospital ICU: continuing improvement between 2000 and 2013. *J Antimicrob Chemother,* Sep 3. pii: dku338. [Epub ahead of print].

61) Edwards-Jones V., Claydon M.A., Evason D.J., Walker J., Fox A.J. & Gordon D.B. 2000. Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant Staphylococcus aureus by intact cell mass spectrometry, *J Med Microbiol*, 49(3), 295-300.

62) Eber MR, Laxminarayan R, Perencevich EN. & Malani A. 2010. Clinical and economic outcomes attributable to health care-associated sepsis and pneumonia. *Arch Intern Med.* 170(4), 347-53.

63) Espinal P., Seifert H., Dijkshoorn L., Vila J. & Roca I. 2012. Rapid and accurate identification of genomic species from the Acinetobacter baumannii (Ab) group by MALDI-TOF MS -TOF MS, *Clin Microbiol Infect*, 18, 1097–103.

64) Euzéby J.P. 2014. List of Prokaryotic Names with Standing in Nomeclature-Genus *Staphylococcus*. [Online]. Available: http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html, [Accessed 9 September 2014].

65) Embrapa 2014. Brasil: Embrapa, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. *Coleções biológicas* [Online]. Available: https://www.embrapa.br/busca-geral/-/busca/, coleções biologicas [Acessado em outubro 2014].

66) ECCO 2014. European Culture Collections Organisation. *Ecco statutes ECCO* [Online]. Available: http://www.eccosite.org/ [Accessed October 2014].

67) Fluit A.C., Box A.T. & Verhoef J. 1990. A probe for the detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus", *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 9(8), 605-8.

68) Funke, G. & P. Funke-Kissling. 2004. Evaluation of the new VITEK 2 card for identification of clinically relevant gram-negative rods. *J. Clin.Microbiol.* 42, 4067-71.

69) Funke, G. & P. Funke-Kissling. 2005. Performance of the new VITEK 2 card for identification of medically relevant gram-positive cocci in a routine clinical laboratory. *J. Clin. Microbiol.*, 43, 84-8.

70) Fonseca E.L., Freitas Fdos S. & Vicente A.C. 2010. The colistin-only-sensitive Brazilian Pseudomonas aeruginosa clone SP (sequence type 277) is spread worldwide, *Antimicrob Agents Chemother*, 54(6), 2743.

71) Fernández-Olmos A, García-Castillo M., Morosini M.I., Lamas A., Máiz L. & Cantón R. 2012. MALDI-TOF MS improves routine identification of non-fermenting Gram negative isolates from cystic fibrosis patients, *J Cyst Fibros*, 11(1), 59-62.

72) Fysaraki M., Samonis G., Valachis A., Daphnis E., Karageorgopoulos D.E., Falagas M.E., Stylianou K. & Kofteridis D.P. 2013. Incidence, clinical, microbiological features and outcome of bloodstream infections in patients undergoing hemodialysis. *Int J Med Sci,* 10(12), 1632-8.

73) Fernandes R., Amador P., Oliveira C. & Prudêncio C. 2014. Molecular characterization of ESBL producing Enterobacteriaceae in northern Portugal, *Scientific World Journal,* 13, 782897.

74) Fiocruz 2014. Brasil: Fiocruz, Fundação Oswaldo Cruz. *Coleções biológicas* [Online]. Disponível em: http://portal.fiocruz.br/pt-br/content/coleções-biológicas [Acessado em outubro 2014].

75) Greenwood D. 2000. *Antimicrobial Chemotherapy.* 5ed. Oxford: Oxford University Press.

76) Gales, A.C., Jones, R.N., Turnidge J., Rennie, R. & Ramphal, R. 2001a. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates: occurrence rates, antimicrobial susceptibility patterns, and molecular typing in the global SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999, *Clin. Infect. Dis*, 32(2), 146-155.

77) Gales, A.C., Menezes, L.C., Silbert, S. & Sader, H.S. 2003. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-β-lactamase. *J. Antimicrob. Chemother.* 52: 699-702.

78) Gales, A.C., Torres, P.L., Vilarinho, D.S., Melo, R.S., Silva, C.F. & Cereda, R.F. 2004. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in an intensive care unit of a teaching hospital. *Braz. J. Infect. Dis*. 8: 267-271.

79) Gales A.C., Castanheira M., Jones R.N. & Sader H.S. 2012. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010), *Diagn Microbiol Infect* 73(4), 354-60.

80) Guilarde A.O., Turchi M.D., Martelli C.M., Primo M.G. & de Abreu Batista L.J. 2007. Bacteremias at a teaching hospital: etiology, antimicrobial susceptibility pattern and risk factors for mortality, *Rev Assoc Med Bras.* 53(1), 34-8.

81) Gonçalves D.C., Lima A.B., Leão L.S., Filho J.R., Pimenta F.C. & Vieira J.D. 2009. Detection of metallo-beta-lactamase in Pseudomonas aeruginosa isolated from hospitalized patients in Goiânia, State of Goiás, *Rev Soc Bras Med Trop*, 42(4), 411-4.

82) Gan H.M, Lean S.S, Suhaili Z, Thong K.L. & Yeo C.C. 2012. Genome sequence of Acinetobacter baumannii AC12, a polymyxin-resistant strain isolated from Terengganu, Malaysia. *J Bacteriol.* 194(21):5979-80.

83) García-Álvarez L., Holden M.T., Lindsay H., Webb C.R., Brown D.F., Curran M.D., Walpole E., Brooks K., Pickard D.J., Teale C., Parkhill J., Bentley S.D., Edwards G.F.,

Girvan E.K., Kearns A.M., Pichon B., Hill R.L., Larsen A.R., Skov R.L., Peacock S.J., Maskell D.J. & Holmes M.A. 2011. Meticillin-resistant Staphylococcus aureus with a novel mecA homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study, *Lancet Infect Dis,* 11(8), 595-603.

84) Governo do Distrito Federal, Secretaria de Estado de Saúde, Subsecretaria de Vigilância a saúde, Gerência de investigação e prevenção à infecção e eventos adversos em serviços de saúde. Protocolo para manejo se surto de Enterobactérias produtoras de carbapenemase tipo KPC. (2011), Disponível em: www.saude.df.gov.br/sites/300/313/00000048.pdf

85) Gupta N, Limbago B.M, Patel J.B. & Kallen A.J. 2011. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: epidemiology and prevention. Clin Infect Dis., 53(1):60-7.

86) Girlich D., Poirel L. & Nordmann P. 2012. Value of the modified Hodge test for detection of emerging carbapenemases in Enterobacteriaceae, *J Clin Microbiol*, 50(2), 477-9.

87) Griffin P.M., Price G.R., Schooneveldt J.M., Schlebusch S., Tilse M.H., Urbanski T., Hamilton B. & Venter D. 2012. Use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to identify vancomycin-resistant enterococci and investigate the epidemiology of an outbreak. *J Clin Microbiol,* 50(9), 2918-31.

88) Gelatti L.C., Bonamigo R.R., Inoue F.M., Carmo M.S., Becker A.P., Castrucci F.M., Pignatari A.C. & D' Azevedo P.A. 2013. Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus carrying SCCmec type IV in southern Brazil, *Rev Soc Bras Med Trop*, 46(1), 34-8.

89) Gedik H., Yıldırmak T., Simşek F., Kantürk A., Arıca D., Aydın D., Yokuş O. & Demirel N., Arabacı C. 2014. Vancomycin-resistant enterococci colonization and bacteremia in patients with hematological malignancies. *J Infect Dev Ctries,* 8(9), 1113-8.

90) Guo L., Ye L., Zhao Q., Ma Y., Yang J. & Luo Y. 2014. Comparative study of MALDI-TOF MS and VITEK 2 in bacteria identification. J Thorac Dis, May 6(5), 534-8.

91) Hillenkamp, F. & Karas, M. 1991. Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Biopolymers. *Anal. Chem*, 63, 1193-1203.

92) Hancock, R.E.W. 1998. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. *Clin. Infect. Dis.* 27 (Suppl 1): S93-S99.

93) Héritier C., Poirel L., Fournier P.E., Claverie J.M., Raoult D. & Nordmann P. 2005. Characterization of the naturally occurring oxacillinase of Acinetobacter baumannii. *Antimicrob Agents Chemother,* 49(10), 4174-9.

94) Hasman H, Mevius D, Veldman K, Olesen I. & Aarestrup FM. 2005. Beta-Lactamases among extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-resistant Salmonella from poultry,

poultry products and human patients in The Netherlands. *J Antimicrob Chemother.* 56(1):115-21.

95) Hanson N.,D. Molecular diagnostics could help in coping with hidden b-lactamases. 2010. *Microbe.* 5, 333-8.

96) Higgins PG, Lehmann M. & Seifert H. 2010. Inclusion of OXA-143 primers in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in Acinetobacter spp. *Int J Antimicrob Agents,* 35(3), 305.

97) Hirsch E.B. & Tam V.H. 2010. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection, *J Antimicrob Chemother*, 65(6),1119-25.

98) Hrabák J., Walková R., Studentová V., Chudácková E. & Bergerová T. 2011 Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol,* 49(9), 3222-7.

99) Hrabák J, Chudácková E. & Walková R. 2013. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (maldi-tof) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis. *Clin Microbiol*, 26(1),103-14.

100) Huang J., Wang M., Ding H., Ye M., Hu F., Guo Q., Xu X. & Wang M., 2013. New Delhi metallo-β-lactamase-1 in carbapenem-resistant Salmonella strain, *Emerg Infect Dis.*,19(12), 2049-51.

101) Hoyos-Mallecot Y., Riazzo C., Miranda-Casas C., Rojo-Martín M.D, Gutiérrez-Fernández J. & Navarro-Marí JM. 2014. Rapid detection and identification of strains carrying carbapenemases directly from positive blood cultures using MALDI-TOF MS. *J Microbiol Methods*, 105, 98-101.

102) Hsueh P.R, Kuo L.C, Chang T.C, Lee T.F, Teng S.H, Chuang Y.C, Teng L.J & Sheng W.H. 2014. Evaluation of the Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of blood isolates of Acinetobacter species, *J Clin Microbiol*, 52(8), 3095-100.

103) Hu F, O'Hara J.A, Rivera J.I e Doi Y. 2014. Molecular Features of Community-Associated Extended-Spectrum β-Lactamase-Producing Escherichia coli Strains in the United States. *Antimicrob Agents Chemother,* 18, 3321-14.

104) Hayakawa K., Martin E.T., Gudur U.M., Marchaim D., Dalle D., Alshabani K., Muppavarapu K.S., Jaydev F., Bathina P., Sundaragiri P.R., Rajuri S.D., Khatri J., Pogue J.M., Lephart P.R., Rybak M.J. & Kaye K.S. 2014. Impact of different antimicrobial therapies on clinical and fiscal outcomes of patients with bacteremia due to vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob Agents Chemother,* 58(7), 3968-75.

105) Ito T., Okuma K., Ma X.X., Yuzawa H. & Hiramatsu K. 2003. Insights on antibiotic *resistance of Staphylococcus aureus from its whole genome: genomic island SCC. Drug Resist Updat,* 6(1), 41-52.

106) Ito T., Hiramatsu K., Tomasz A., de Lencastre H., Perreten V., Holden M.T., Coleman D.C., Goering R., Giffard P.M., Skov R.L., Zhang K., Westh H., O'Brien F., Tenover F.C., Oliveira D.C., Boyle-Vavra S., Laurent F., Kearns A.M., Kreiswirth B., Ko K.S., Grundmann H., Sollid J.E., John J.F. Jr., Daum R., Soderquist B. & Buist G. 2012. International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). Guidelines for reporting novel mecA gene homologues. *Antimicrob Agents Chemother,* 56(10), 4997-9.

107) ISO 2014. International Organization For Standardization. [Online]. Available: http://www.iso.org/iso/en/ISOOnline.frontpage [Accessed in October 2014].

108) Jarlier V., Nicolas M. H., Fournier G. & Philippon A. 1988. Extended broad-spectrum betalactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev. Infect. Dis.*, 10(4), 867-878.

109) Jacob G. & Bush K. 2011. ß-Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes-LAHEY STUDIES, Disponível em http://www.lahey.org/Studies/

110) Jacob G & Bush K. 2014. ß-Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes-LAHEY STUDIES (On Line). Available at: http://www.lahey.org/Studies/ e http://www.lahey.org/Studies/other.asp (Accessed in October 2014).

111) Jefferies JM, Cooper T, Yam T & Clarke SC. 2012. Pseudomonas aeruginosa outbreaks in the neonatal intensive care unit--a systematic review of risk factors and environmental sources. *J Med Microbiol,* 61(Pt 8), 1052-61.

112) Kaplan A.H., Gilligan P.H. & Facklam R.R. 1988. Recovery of resistant enterococci during vancomycin prophylaxis, J *Clin Microbiol,* 26(6),1216-8.

113) Kirst H.A., Thompson D.G. & Nicas T.I. 1998. Historical yearly usage of vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother*, 42, 1303-4.

114) Katayama Y., Ito T. & Hiramatsu K. 2000. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in Staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother*, 44(6), 1549-55.

115) Kang C.I., Kim S.H., Park W.B., Lee K.D., Kim H.B., Kim E.C., Oh M.D. & Choe K.W. 2005. Bloodstream infections caused by antibiotic-resistant gram-negative bacilli: risk factors for mortality and impact of inappropriate initial antimicrobial therapy on outcome. *Antimicrob Agents Chemother,* 49(2), 760-6.

116) Kokis, V.M., Moreira, B.M., Pellegrino, F.L.P.C., Silva, M.G., Long, J.B., Bastos, C.C.R. & Santos, K.R.N. 2005. Identification of an imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone among patients in a hospital in Rio de Janeiro, *J. Hosp. Infect*, 60, 19-26.

117) Kallow, W., Santos, I.M., Erhard, M., Serra, R., Venâncio, A. & Lima, N. 2006. *Aspergillus ibericus*: a new species of section *Nigri* characterised by MALDI-TOF MS. In: Proceedings of 8th International Mycological Congress (Eds: W. Meyer & C. Pearce). *Medimond* S.r.l, Bologna, 189-193.

118) Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, Suppes R, Feinstein D, Zanotti S, Taiberg L, Gurka D, Kumar A, Cheang M. 2006. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care* Med., 34(6), 1589-96.

119) Kumar A., Randhawa V.S., Nirupam N., Rai Y. & Saili A. 2014. Risk factors for carbapenem-resistant Acinetobacter baumanii blood stream infections in a neonatal intensive care unit, Delhi, India. *J Infect Dev Ctries,* 8(8), 1049-54.

120) Klein N.M., 2006. Ocorrência e suscetibilidade a drogas antifúngicas da *Candida* spp *não albicans*, no Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes, Vitória-ES. Dissertação de mestrado, Vitória: Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

121) Klein, M.K., Santos, C., Lima, N. & Asensi, M.D. 2011. Establishment of a bacterial strain reference culture collection- university hospital Cassiano Antônio de Moraes (CCBR-HUCAM), Vitória Espírito Santo, Brasil. *ECCO XXX Meeting, Conference Proceedings*, Poster 22, Utrecht, Netherlands.

122) Klein, M.K., Santos, C., Lima, N. & Asensi, M.D. 2012. Identification and Preservation of Multiresistant Bacteria isolated from Bloodstream Infections of patients at a hospital in Brazil. *ECCO XXXI Meeting, abstracts book,* P63, Micoteca da Universidade do Minho, Braga.

123) Koneman, E.W., Winn C.W., Allen S.D., Janda W.M., Schreckenberger P.C., Procop G.W. & Woods G.L 2008., *Koneman Diagnóstico Microbiológico Texto e Atlas Colorido*, 6ª ed, Editora Guanabara Koogan S/A, Rio de Janeiro.

124) Karisik E., Ellington M.J., Livermore D.M. & Woodford N. 2008. Virulence factors in Escherichia coli with CTX-M-15 and other extended-spectrum beta-lactamases in the UK, *J Antimicrob Chemother*, 61(1), 54-8.

125) Köck R., Becker K., Cookson B., Van Gemert-Pijnen J.E., Harbarth S., Kluytmans J., Mielke M., Peters G., Skov R.L., Struelens M.J., Tacconelli E., Navarro Torné A., Witte W. & Friedrich A.W. 2010. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. *Euro Surveill,* 15(41), 19688.

126) Kilic A & Baysallar M. 2014. Identification of staphylococci directly from positive blood culture bottles by MALDI-TOF MS system, *Mikrobiyol Bul*, 48(3), 377-84.

127) Kim S, Sung J.Y., Cho H.H., Kwon K.C. & Koo S.H. 2014. Characterization of CTX-M-14- and CTX-M-15-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Urine Specimens in a Tertiary-Care Hospital, J Microbiol Biotechnol, 28 24(6), 765-70.

128) Kargar M, Jahromi M.Z., Najafi A. & Ghorbani-Dalini S. 2014. Molecular detection of ESBLs production and antibiotic resistance patterns in Gram negative bacilli isolated from urinary tract infections. *Indian J Pathol Microbiol,* 57(2), 244-8.

129) Livermore, D.M. 1992. Interplay of impermeability and chromosomal β-lactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36, 2046-2048.

130) Livermore, D.M. 2002. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare?", *Clin. Infect. Dis*, 34, 634-640.

131) Livermore D.M., Canton R., Gniadkowski M., Nordmann P., Rossolini G.M., Arlet G., Ayala J., Coque T.M., Kern-Zdanowicz I., Luzzaro F. & Poirel L. 2007. Woodford N. CTX- M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother*, 59(2), 165-74.

132) Livermore D.M., Warner M., Mushtaq S., Doumith M., Zhang J. & Woodford N. 2011. What remains against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae? Evaluation of chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, fosfomycin, minocycline, nitrofurantoin, temocillin and tigecycline. *Int J Antimicrob Agents*, 37(5), 415-9.

133) Livermore D.M. 2012. Fourteen years in resistance. *J. Antimicrob. Agents,* 39, 283-294.

134) Levin A.S, Levy C.E., Manrique A.E., Medeiros E.A. & Costa S.F. 2003. Severe nosocomial infections with imipenem-resistant Acinetobacter baumannii treated with ampicillin/sulbactam. *Int J Antimicrob Agents*, 21(1), 58-62.

135) Lima, N., Rodrigues, P., Soares, C., Santos, C., Paterson, R. & Venâncio, A. 2003. Modern Polyphasic Methods that Include MALDI-TOF Analyses for Fungal Identifications and Authentications. European Culture Collections. *Organization Meeting XXVII (ECCO XXVII)*, Vol. 10th -11th June, 11.

136) Lima, N. 2008. Quality control of microbial resources: the new demands of the bioeconomy era. In: Workshop Internacional em Biotecnologia, do III Encontro ALFA-VALNATURA (Valorização de Recursos Naturais), III Jornada Científica do LIKA/Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Recife, Brasil; pp: 327-328.

137) Lee K., Lim Y.S., Yong D., Yum J.H. & Chong Y. 2003. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo-beta-

lactamase-producing isolates of Pseudomonas spp. and Acinetobacter spp. *J Clin Microbiol,* 41(10), 4623-9.

138) Lee S.C., Hua C.C., Yu T.J., Shieh W.B. & See L.C. 2005. Risk factors of mortality for nosocomial pneumonia: importance of initial anti-microbial therapy. *Int J Clin Pract*, 59(1), 39-45.

139) Lee J., Patel G., Huprikar S., Calfee D.P. & Jenkins S.G. 2009. Decreased susceptibility to polymyxin B during treatment for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection, *J Clin Microbiol*, 47(5), 1611-2.

140) Lee Y.T., Kuo SC., Chiang M.C., Yang S.P., Chen C.P., Chen T.L. & Fung C.P. 2012., "Emergence of carbapenem-resistant non-baumannii species of Acinetobacter harboring a blaOXA-51-like gene that is intrinsic to A. baumannii. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(2), 1124-1227.

141) Lee W, Chung H.S., Lee Y., Yong D., Jeong S.H., Lee K. & Chong Y. 2013a. Comparison of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry assay with conventional methods for detection of IMP-6, VIM-2, NDM-1, SIM-1, KPC-1, OXA-23, and OXA-51 carbapenemase-producing Acinetobacter spp., Pseudomonas aeruginosa, and Klebsiella pneumoniae, *Diagn Microbiol Infect Dis*, 77(3), 227-30.

142) Lee H.G., Jang J., Choi J.E., Chung DC., Han J.W., Woo H., Jeon W. & Chun B.C. 2013b. Blood stream infections in patients in the burn intensive care unit. *Infect Chemother,* 45(2), 194-201.

143) Lee M.J, Jang S.J, Li X.M, Park G, Kook J.K, Kim M.J, Chang Y.H, Shin J.H, Kim S.H, Kim D.M, Kang S.H & Moon D.S. 2014. Comparison of rpoB gene sequencing, 16S rRNA gene sequencing, gyrB multiplex PCR, and the VITEK2 system for identification of Acinetobacter clinical isolates, *Diagn Microbiol Infect Dis*, 78(1), 29-34.

144) Lincopan, N., McCulloch, J.A., Reinert, C., Cassettri, V.C., Gales, A.C. & Mamizuka, E.M. 2005. First isolation of metallo-β-lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 43, 516-519.

145) Leelaporn A, Yongyod S., Limsrivanichakorn S., Yungyuen T. & Kiratisin P. 2008. Francisella novicida bacteremia, Thailand. *Emerg Infect Dis,* 14(12), 1935-7.

146) Lagacé-Wiens P.R., Adam H.J., Karlowsky J.A., Nichol K.A., Pang P.F., Guenther J., Webb A.A., Miller C. & Alfa M.J. 2012. Identification of blood culture isolates directly from positive blood cultures by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and a commercial extraction system: analysis of performance, cost, and turnaround time. *J Clin Microbiol*, 50(10), 3324-8.

147) Laurent F., Chardon H., Haenni M., Bes M., Reverdy M.E., Madec J.Y., Lagier E., Vandenesch F. & Tristan A. 2012. MRSA harboring mecA variant gene mecC, France. *Emerg Infect Dis.* 18(9), 1465-7.

148) LPSN 2014. List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature (On Line). Available at: http://www.bacterio.net (Accessed in October 2014).

149) Lima-Neto R, Santos C, Lima N, Sampaio P, Pais C. & Neves RP. 2014. Application of MALDI-TOF MS for requalification of a Candida clinical isolates culture collection. *Braz J Microbiol.* 45(2), 515-22.

150) Lau A.F., Wang H., Weingarten R.A., Drake S.K., Suffredini A.F., Garfield M.K., Chen Y., Gucek M., Youn J.H., Stock F., Tso H., DeLeo J., Cimino J.J., Frank K.M., & Dekker J.P. 2014. A rapid matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based method for single-plasmid tracking in an outbreak of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol,* 52(8), 2804-12.

151) Marchandin, H., Jean-Pierre, H., Champs, C., Sirot, D., Darbas, H., Perigault, F. & Carriere, C. 2000. Production of a TEM-24 plasmid-mediated extended-spectrum β-lactamase by a clinical isolate of Pseudomonas aeruginosa. *Antimicrob. Agents Chemother*, 44, 213-216.

152) Maseda, H., Yoneyama, H. & Nakae, T. 2000. Assignment of the substrate-selective subunits of the MexEF-OprN multidrug efflux pump of Pseudomonas aeruginosa. *Antimicrob. Agents Chemother*, 44, 658-664.

153) Mayaud, C. & Cadranel, J. 2000. A persistent challenge: the diagnosis of respiratory disease in the non-AIDS immunocompromised host, *Thorax*., 55, 511.

154) Mulvey MR, Soule G, Boyd D, Demczuk W. & Ahmed R. 2003. Multi-provincial Salmonella Typhimurium Case Control Study Group. Characterization of the first extended-spectrum beta-lactamase-producing Salmonella isolate identified in Canada. *J Clin Microbiol.* 41(1), 460-2.

155) Mendes C., Oplustil C., Sakagami E., Turner P. & Kiffer C. 2005. MYSTIC Brazil Group. Antimicrobial susceptibility in intensive care units: MYSTIC Program Brazil 2002. Braz. *J Infect Dis,* 9(1), 44-51.

156) Majcherczyk P.A., McKenna T., Moreillon P. & Vaudaux P. 2006. The discriminatory power of MALDI-TOF mass spectrometry to differentiate between isogenic teicoplanin-susceptible and teicoplanin-resistant strains of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *FEMS Microbiol Lett,* 255(2), 233-9.

157) Morgan, C. A.; Herman, N.; White, P. A. & Vesey, G. 2006. Preservation of micro-organisms by drying- a review. *J. of Microb.l Methods*, 66(2), 183-193.

158) Máttar S. & Martinez P. 2007. Emergence of antimicrobial resistance to extended-spectrum-ββ ββ β-lactamases (ESBL): detection, clinic impact and epidemiology. *Asociación colombiana de infectología,* 11(1), 23-25.

159) Mendonça N, Leitão J, Manageiro V. & Ferreira E. The Antimicrobial Resistance Surveillance Program in Portugal, Caniça M. 2007. Spread of Extended-Spectrum β-Lactamase CTX-M-Producing *Escherichia coli* Clinical Isolates in Community and Nosocomial Environments in Portugal. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51(6), 1946

160) Mesiano E.R. & Merchán-Hamann E. 2007. Bloodstream infections among patients using central venous catheters in intensive care units. *Rev Lat Am Enfermagem.* 15(3), 453-9.

161) Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen, *et al*. Manual of Clinical Microbiology. v.1, 9 ed, Washington (USA); Ed.American Society for Microbiology (ASM). 2007. p.649-698.

162) Miyamoto-Shinohara Y, Sukenobe J, Imaizumi T. & Nakahara T. 2008. Survival of freeze-dried bacteria. *J Gen Appl Microbiol.* 54(1), 9-24.

163) Merquior V.L., Gonçalves Neves F.P., Ribeiro R.L., Duarte R.S., Andrade M. E. & Teixeira L.M. 2008. Bacteraemia associated with a vancomycin-resistant Enterococcus gallinarum strain harbouring both the vanA and vanC1 genes. *J Med Microbiol.* 57(2), 244-5.

164) Monteiro J, Santos AF, Asensi MD, Peirano G &, Gales AC. 2009. First report of KPC-2- producing Klebsiella pneumoniae strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 53(1), 333-4.

165) Manchanda V, Sanchaita S. & Singh N. 2010. Multidrug resistant acinetobacter. J *Glob Infect Dis*., 2(3), 291-304.

166) Marra A.R., Camargo L..F, Pignatari A.C., Sukiennik T., Behar P.R., Medeiros E.A., Ribeiro J., Girão E., Correa L., Guerra C., Brites C., Pereira C.A., Carneiro I., Reis M, de Souza M.A., Tranchesi R., Barata C.U. & Edmond M.B. 2011. Brazilian SCOPE Study Group. Nosocomial bloodstream infections in Brazilian hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. *J Clin Microbiol,* 49(5), 1866-71.

167) Ma L., Siu L.K., Lin J.C., Wu T.L., Fung C.P., Wang J.T., Lu P.L & Chuang Y.C. 2013. Updated molecular epidemiology of carbapenem-non-susceptible Escherichia coli in Taiwan: first identification of KPC-2 or NDM-1-producing E. coli in Taiwan. *BMC Infect Dis*, 20, 13, 599.

168) Marschall J., Piccirillo M.L., Fraser V.J., Doherty J.A. & Warren D.K. 2013. Catheter removal versus retention in the management of catheter-associated enterococcal bloodstream infections. *Can J Infect Dis Med Microbiol,* 24(3), 83-7.

169) McConeghy K.W., Bleasdale S.C. & Rodvold K.A. 2013. The empirical combination of vancomycin and a β-lactam for Staphylococcal bacteremia. *Clin Infect Dis*, 57, 1760-5.

170) Mencacci A., Monari C., Leli C., Merlini L., De Carolis E., Vella A., Cacioni M., Buzi S., Nardelli E., Bistoni F., Sanguinetti M. & Vecchiarelli A. 2013. Typing of nosocomial outbreaks of Acinetobacter baumannii by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol,* 51(2), 603-6.

171) Neuman K., Cox D. & Bullough K. 1998. Transmission of vancomycin-resistant enterococcus among family members: a case study. *J Community Health Nurs*, 15, 9-20.

172) Nakajima, K. et al. 2001. Disk diffusion and microdilution tests for screening metallo-β-lactamase producing bacteria. *Abstract C-287. In:101thASM General Metting, Orlando*.

173) Nordmann, P. & Poirel, L. 2002. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes, *Clin. Microbiol. Infect*, 8, 321-331.

174) Nordmann P, Cuzon G. & Naas T. 2009. The real threat of Klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing bacteria*. Lancet Infect Dis*., 9(4), 228-36.

175) Nordmann P., Poirel L., Walsh T.R. & Livermore D.M. 2011.The emerging NDM carbapenemases, *Trends Microbiol*, 19(12), 588-95.

176) Nordmann P., Dortet L. & Poirel L. 2012. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! *Trends Mol. Med.* 18, 263–272.

177) Nordmann, P. & Cornaglia, G. 2012. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: a call for action!, *Clin Microbiol Infect*, 18(5), 411-2.

178) Nikaido H. 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev,* 67(4), 593-656.

179) Nadarajah J., Lee M.J., Louie L., Jacob L., Simor A.E., Louie M. & McGavin M.J. 2006, Identification of different clonal complexes and diverse amino acid substitutions in penicillin-binding protein 2 (PBP2) associated with borderline oxacillin resistance in Canadian Staphylococcus aureus isolates. *J Med Microbiol,* 55(Pt 12), 1675-83.

180) Nagy E., Becker S., Sóki J., Urbán E. & Kostrzewa M. 2011. Differentiation of division I (cfiA-negative) and division II (cfiA-positive) Bacteroides fragilis strains by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. J *Med Microbiol,* 60, 1584-90.

181) Olive, D.M. & Bean, P. 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J. Clin. Microbiol*, 37, 1661-1669.

182) Oliveira DC & de Lencastre H. 2002. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural *types and variants of the mec element in methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother.* 46(7), 2155-61.

183) Obritsch, M.D., Fish, D.N., MacLaren, R. & Jung, R. 2004. National surveillance of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from intensive care unit patients from 1993 to 2002. *Antimicrob. Agents Chemother*, 48, 4606-4610.

184) Opazo A, Domínguez M, Bello H, Amyes SG. & González-Rocha G. 2012. OXA-type carbapenemases in Acinetobacter baumannii in South America. *J Infect Dev Ctries.* 6(4), 311-6.

185) OMS- Organização Mundial da Saúde. (On line). Antimicrobial resistance: Global Report on Surveillance. Disponível em: http://www.who.int/drugresistance/en/ (Accessed in October 2014).

186) Pollack, M. 1995. Pseudomonas aeruginosa. In: *Principles and practice of infectious diseases.*(Mandell, G.L., Benett, J.E., Dolin, R. Eds), New York, Churchill Livingstone.

187) Poirel, L., Weldhagen, G.F., Naas, T., De Champs, C., Dove, M.G. & Nordmann, P. 2001. GES-2, a class A beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 2598-2603.

188) Poirel L., Magalhães M., Lopes M. & Nordmann P. 2004. Molecular analysis of metallo-β-lactamase gene bla_{SPM-1}-surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Recife, Brazil, *Antimicrob. Agents Chemother*, 48, 1406-1409.

189) Poirel, L., Marqué, S., Héritier, C., Segonds, C., Chabanon, G. & Nordmann, P. 2005. OXA-58, a novel class D β-lactamase involved in resistance to carbapenems in Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother*, 49, 202-208.

190) Poirel L., Naas T. & Nordmann P. 2010. Diversity, epidemiology, and genetics of class D b- lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 54, 24-38.

191) Poirel L., Walsh T.R., Cuvillier V. & Nordmann P. 2011. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis,* 70(1), 119-23.

192) Poirel L., Potron A. & Nordmann P. 2012. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *Journal Antimicrob Chemother*, 67,1597-1606.

193) Paterson D.L. & Bonomo R.A. 2005. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.,* 18(4), 657-8.

194) Paterson, R., Simões, M.F., Pereira, L., Santos, C. & Lima, N. 2012. Biological Resource Centres: Closing the gap between science and society. ECCO XXXI meeting, abstract book. Micoteca da Universidade do Minho, Braga.

195) Peleg A.Y, Seifert H. & Paterson D.L. 2008. Acinetobacter baumannii: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev.,* 21(3), 38-82.

196) Picão R.C, Andrade S.S., Nicoletti A.G., Campana E.H., Moraes G.C., Mendes R.E. & Gales A.C. 2008. Metallo-beta-lactamase detection: comparative evaluation of double-

disk synergy versus combined disk tests for IMP-, GIM-, SIM-, SPM-, or VIM-producing isolates. *J Clin Microbiol.* 46(6), 2028-37.

197) Peirano G., Seki L.M., Val Passos V.L., Pinto M.C., Guerra L.R. & Asensi M.D. 2009. Carbapenem-hydrolysing beta-lactamase KPC-2 in Klebsiella pneumoniae isolated in Rio de Janeiro, Brazil. *J Antimicrob Chemother.* 63(2), 265-8.

198) Pereira, L., Dias N., Santos, C. & Lima, N. 2010. MALDI-TOF ICMS: Capability, potentiality and limits in the fast identification of Trichophyton Rubrum from clinical cases occurrence in portuguese health centres. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(2) S530, 1795.

199) Pereira, L., Dias N., Santos, C. & Lima, N. 2013. The use of MALDI-TOF ICMS as an alternative tool for Trichophyton rubrum identification and typing. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 32,1.

200) Pasteran F, Mendez T, Rapoport M, Guerriero L. & Corso A. 2010. Controlling false-positive results obtained with the Hodge and Masuda assays for detection of class a carbapenemase in species of Enterobacteriaceae by incorporating boronic Acid. *J Clin Microbiol*, 48(4),1323-32.

201) Pittalis S., Ferarro F., Puro V. 2011. NDM-1: the superbug? *Infez Med.*,19(4), 224- 34.

202) Primo M.G., Guilarde A.O., Martelli C.M., Batista L.J. & Turchi M.D. 2012. Healthcare-associated Staphylococcus aureus bloodstream infection: length of stay, attributable mortality, and additional direct costs. *Braz J Infect Dis,* 6(6), 503-9.

203) Papagheorghe R. 2012. Bloodstream infections in immunocompromised hosts. *Roum Arch Microbiol Immunol*, 1(2), 87-94.

204) Polotto M, Casella T, de Lucca Oliveira MG, Rúbio FG, Nogueira ML, de Almeida MT & Nogueira MC. 2012. Detection of P. aeruginosa harboring bla CTX-M-2, bla GES-1 and bla GES-5, bla IMP-1 and bla SPM-1 causing infections in Brazilian tertiary-care hospital. *BMC Infect Dis.,* 3;12, 176.

205) Posteraro B., Vella A., Cogliati M., De Carolis E., Florio A.R., Posteraro P., Sanguinetti M. & Tortorano A.M. 2012. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based method for discrimination between molecular types of Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii. *J Clin Microbiol*, 50(7), 2472-6.

206) Petersen A., Stegger M., Heltberg O., Christensen J., Zeuthen A., Knudsen L.K., Urth T., Sorum M., Schouls L., Larsen J., Skov R. & Larsen A.R. 2013. Epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus carrying the novel mecC gene in Denmark corroborates a zoonotic reservoir with transmission to humans. *Clin Microbiol Infect,* 19(1),16-22.

207) Potron A., Poirel L., Rondinaud E. & Nordmann P. 2013. Intercontinental spread of OXA-48 beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae over a 11-year period, 2001 to 2011. *Euro Surveill.* 18(31).

208) Pillonetto M., Arend L., Vespero E.C., Pelisson M., Chagas T.P.,' Carvalho-Assef A.P. & Asensi M.D. 2014. The first report of NDM-1-producing Acinetobacter baumannii ST 25 in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.*, Oct 6. pii: AAC.03444-14. [Epub ahead of print].

209) Peirano G., van der Bij A.K., Freeman J.L., Poirel L., Nordmann P., Costello M., Tchesnokova V.L. & Pitout JD. 2014. Characteristics of Escherichia coli sequence type 131 isolates that produce extended-spectrum β-lactamases: global distribution of the H30-Rx sublineage. *Antimicrob Agents Chemother.,* 58(7), 3762-7.

210) Queenan A.M. & Bush K. 2007. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev,* 20(3), 440-58.

211) Ryzhov, V. & Fenselau, C. 2001. Characterization of the protein subset desorbed by MALDI from whole bacterial cell. *Analytical Chemistry,* 73, 746-750.

212) Rosenthal V.D., Gusman S., Migone O. & Crnich C.J. 2003. The attributable cost, length of hospital stay, and mortality of attributable cost, length of hospital stay, and mortality of central line-associated bloodstream infection in intensive care departaments in Argentina: A prospective, matched analysis. *Am J Infect Control,* 31, 475-80.

213) Rosenthal V.D., Maki D.G., Mehta A., Alvarez-Moreno C., Leblebicioglu H., Higuera F., Cuellar L.E., Madani N., Mitrev Z., Dueñas L., Navoa-Ng J.A., Garcell H.G., Raka L., Hidalgo R.F., Medeiros E.A., Kanj S.S., Abubakar S., Nercelles P., Pratesi R.D. International Nosocomial Infection Control Consortium Members. 2008. *Am J Infect Control.* 36(9), 627-37.

214) Rozenbaum R., Sampaio M.G., Batista G.S., Garibaldi A.M., Terra G.M., Souza M.J., Vieira E.N., Silva-Carvalho M.C., Teixeira L.A. & Figueiredo A.M. 2009. The first report in Brazil of severe infection caused by community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus (CA-MRSA). *Braz J Med Biol Res.*,42(8), 756-60.

215) Romero-Gómez M.P., Gómez-Gil R., Paño-Pardo J.R & Mingorance J. 2012. Identification and susceptibility testing of microorganism by direct inoculation from positive blood culture bottles by combining MALDI-TOF and Vitek-2 Compact is rapid and effective. *J Infect*, 65(6), 513-20.

216) Ratcliffe, P., Fang, H., Thidholm, E., Boräng, S., Westling, K. & Özenc,i V. 2013. Comparison of MALDI-TOF MS and VITEK®2 system for laboratory diagnosis of Granulicatella and Abiotrophia species causing invasive infections. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 77(3), 216-9.

217) Richter S.S, Sercia L., Branda J.A., Burnham C.A., Bythrow M., Ferraro M.J., Garner O.B., Ginocchio C.C., Jennemann R., Lewinski M.A., Manji R., Mochon A.B., Rychert J.A., Westblade L.F. & Procop G.W. 2013. Identification of Enterobacteriaceae by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using the VITEK MS system. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 32(12),1571-8.

218) Rossi F., Diaz L., Wollam A., Panesso D., Zhou Y., Rincon S., Narechania A., Xing G., Di Gioia T.S., Doi A., Tran T.T., Reyes J., Munita J.M., Carvajal L.P., Hernandez-Roldan A., Brandão D., van der Heijden I.M., Murray B.E., Planet P.J., Weinstock G.M. & Arias C.A. 2014. Transferable vancomycin resistance in a community-associated MRSA lineage. N Engl J Med. 370(16), 1524-31.

219) Shiaes, D.M., S. Al-Obeid., & L.Gutmann. 1989. Enterococcal Resistance to vancomycin and teicoplanin. *Alliance Prudent Use Antibiot.News*, 7, 1-8.

220) Senda, K., Arakawa, Y., Nakashima, K., Ito, H., Ichiyama, S., Shimokata, K., Kato, N. & Ohta, M. 1996. Multifocal outbreaks of metallo-β-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad-spectrum β-lactams, including carbapenems. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40, 349-353.

221) Simione, F. P. 1998. Cryopreservation Manual (On line). *Nalge Nunc International Corp*. Disponível em http://www.ehso.emory.edu/content-manuals/cryo.pdf (Accessed in October 2014).

222) Stobberingh E., van den Bogaard A., London N., Driessen C., Top J. & Willems R. 1999. Enterococci with glycopeptide resistance in turkeys, turkey farmers, turkey slaughterers, and (sub)urban residents in the south of The Netherlands: evidence for transmission of vancomycin resistance from animals to humans? *Antimicrob Agents Chemother,* 43(9), 2215-21.

223) Smith C.A. & Baker E.N. 2002. Aminoglycoside antibiotic resistance by enzymatic deactivation. *Curr Drug Targets Infect Disor*d, 2(2), 143-60.

224) Sader, H., Jones, R.N., Gales, A.C., Silva, J.B., Pignatari, A.C. & The Sentry Participants Group (Latin America). 2004a. SENTRY Antimicrobial Surveillance Program Report: Latin American and Brazilian Results for 1997 through 2001. *Braz J. Infect. Dis*, 8, 25-79.

225) Sader, H.S., Reis, A.O., Silbert, S. & Gales, A.C. 2004b. IMPs, VIMs and SPMs: the diversity of metallo-β-lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian hospital. *Clin. Microbiol. Infect*, 11, 73-76.

226) Sader, H. S., Castanheira, M., Mendes, R.E., Toleman, M., Walsh, T.R. & Jones, R.N. 2005. Dissemination and diversity of metallo-β-lactamases in Latin America: report

from the SENTRY antimicrobial surveillance program", *Int. J. Antimicrob. Agents,* 25, 57-61.

227) SBM 2006. Recomendações para Operação e Gerenciamento de Coleções de Culturas de Microrganismos (On line). SBM, *Sociedade Brasileira de Microbiologia.* Disponível em: https://portal.fiocruz.br/sites/portal.fiocruz.br/files/documentos/sbmgerenciamentocolecoesculturas.pdf [Acessado em outubro 2014].

228) Strahilevitz J., Jacoby G.A., Hooper D.C. & Robicsek A. 2009. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev*, Oct 22(4), 664-89.

229) Salabi A.E., Toleman M.A., Weeks J., Bruderer T., Frei R. & Walsh T.R. 2010. First report of the metallo-beta-lactamase SPM-1 in Europe. Antimicrob Agents Chemother, 54, 582.

230) Stevenson L.G., Drake S.K. & Murray P.R. 2010. Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, *J Clin Microbiol*, 48(2), 444-7.

231) Santos, C. & Lima, N., 2010a. A Identificação de Fungos pela Espectrometria de Massa Através da Técnica de MALDI TOF ICMS", *Anais do VI Cong Bras Micol (Eds.: J.C. Dianese, L.T.P. Santos), Soc Bras Micol,* CD-Rom, 566-574.

232) Santos, C. & Lima, N. 2010b. MALDI-TOF ICMS as a powerful technique for strain authentications in culture collections. *12th International Conference on Culture Collections* (ICCC12), Florianópolis, Santa Catarina.

233) Santos, C. & Lima, N. 2011. Identification/characterisation and authentication of microbial Strains by MALDI-TOF ICMS. In: *4th Congress of European Microbiologists*, Genebra.

234) Santos, C., Paterson, R., Venâncio, A. & Lima, N. 2008. Integration of MALDI-TOF MS Data in the Quality Control of Microbial Culture Collections. In: 27th Annual General Meeting of the European Culture Collections' Organisation (XXVII ECCO), Ghent. p. 65.

235) Santos, C., Paterson, R.M.R., Venâncio, A. & Lima, N. 2010. Filamentous fungal characterisations by matrix-assisted laser desorption/ionisation time of flight mass spectrometry. *J. Appl Microbiol*, 108, 375-385.

236) Santos, C., Lima, N., Sampaio, P. & Pais, C. 2011. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight intact cell mass spectrometry to detect emerging pathogenic Candida species. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* , 71, 304-308.

237) Santos, C. 2011. The fast identification of antagonist microorganisms by MALDI-TOF ICMS technique for an effective biological control of pathogens. In: XLIV Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Bento Gonçalves, *Tropical Plant Pathology,* 36, 1345- 46.

238) Schwaber MJ, Klarfeld-Lidji S, Navon-Venezia S, Schwartz D, Leavitt A. & Carmeli Y. 2008. Predictors of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae acquisition among hospitalized adults and effect of acquisition on mortality. *Antimicrob Agents Chemother.,* 52(3),1028-33.

239) Schuenck R.P., Pereira E.M., Iorio N.L. & Dos Santos K.R. 2008. Multiplex PCR assay to identify methicillin-resistant Staphylococcus haemolyticus. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 52(3):431-5.

240) Schuenck R..P, Nouér S.A., Winter Cde O., Cavalcante F.S., Scotti TD, Ferreira A.L., Giambiagi-de Marval M. & dos Santos K.R. 2009. Polyclonal presence of non-multiresistant methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates carrying SCCmec IV in health care-associated infections in a hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 64(4), 34-4.

241) Schuenck R.P., Cavalcante F.S., Emery E., Giambiagi-de Marval M. & dos Santos K.R. 2012. Staphylococcus aureus isolates belonging to different multilocus sequence types present specific virulence gene profiles. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*., 65, 501-4.

242) Seng P., Drancourt M., Gouriet F., La Scola B, Fournier P.E., Rolain J.M. & Raoult D. 2009. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis,* 49(4), 543-51.

243) Stackebrandt E. 2010. Diversification and focusing: strategies of microbial culture collections. *Trends in Microbiology,* 18, 283-7.

244) Seibold E., Maier T., Kostrzewa M., Zeman E. & Splettstoesser W. 2010. Identification of Francisella tularensis by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: fast, reliable, robust, and cost-effective differentiation on species and subspecies levels. *J Clin Microbiol,* 48(4), 1061-9.

245) Shore A.C., Deasy E.C., Slickers P., Brennan G., O'Connell B., Monecke S., Ehricht R. & Coleman D.C. 2011. Detection of staphylococcal cassette chromosome mec type XI carrying highly divergent mecA, mecI, mecR1, blaZ, and ccr genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother,* 55(8):3765-73.

246) Stephan R., Cernela N., Ziegler D., Pflüger V., Tonolla M. & Ravasi D., Fredriksson-Ahomaa M. & Hächler H. 2011. Rapid species specific identification and subtyping of

Yersinia enterocolitica by MALDI-TOF mass spectrometry. *J Microbiol Methods*, 87(2), 150-3.

247) Sparbier K., Schubert S, Weller U, Boogen C. & Kostrzewa M. 2012. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against β-lactam antibiotics. *J Clin Microbiol,* 50(3), 927-37.

248) Simões, M.F., Pereira, L., Santos, C. & Lima, N. 2013a. Chapter 5; Polyphasic identification and preservation of fungal diversity: concepts and applications. In: *Management of Microbial Resources in the Environment.* A. Malik, E. Grohmann and M. Alves (Eds), Springer, Dordrecht, 91-118.

249) Simões, M.F., Santos, C. & Lima, N. 2013b. Structural Diversity of *Aspergillus* (Section *Nigri*) Spores. *Microscopy and Microanalysis*, 10, 1-8.

250) Schulthess B, Brodner K., Bloemberg G.V., Zbinden R., Böttger E.C. & Hombach M. 2013. Identification of Gram-positive cocci by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: comparison of different preparation methods and implementation of a practical algorithm for routine diagnostics.*J Clin Microbiol*, 51(6), 1834-40.

251) Sievert D.M., Ricks P., Edwards J.R., Schneider A., Patel J., Srinivasan A., Kallen A., Limbago B. & Fridkin S. 2013. National Healthcare Safety Network (NHSN) Team and Participating NHSN Facilities. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the CDC, 2009-2010.2013. *Infect Control Hosp Epidemiol.,* 34(1), 1-14.

252) Shimadzu Corporation. 2013. Principles of MALDI-TOF Mass Spectrometry. (Online). Available at: http://www.shimadzu.com/an/lifescience/maldi/princpl1.html [Accessed in October 2014].

253) Seiffert S.N., Marschall J, Perreten V, Carattoli A, Furrer H & Endimiani A. 2014. Emergence of Klebsiella pneumonia e co-producing NDM-1, OXA-48, CTX-M-15, CMY-16, QnrA e ArmA in Switzerland. *Int J Antimicrob Agents*, 44(3), 260-2.

254) Sampaio J.L., Ribeiro V.B., Campos J.C., Rozales F.P., Magagnin C.M., Falci D.R., da Silva R.C., Dalarosa M.G., Luz D.I., Vieira F.J., Antochevis L.C., Barth A.L. & Zavascki A.P. 2014. Detection of OXA-370, an OXA-48-Related Class D β-Lactamase, in Enterobacter hormaechei from Brazil. *Antimicrob Agents Chemother,* 58(6), 3566-7.

255) Saranathan R, Sudhakar P, Karthika RU, Singh SK, Shashikala P, Kanungo R, Prashanth K. 2014. Multiple drug resistant carbapenemases producing Acinetobacter baumannii isolates harbours multiple R-plasmids. *Indian J Med Res.,* 140(2):262-70.

256) Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y. & Yoshida, T. 1988. Protein and polymer analyses up to m/z 100000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2*, 151-153.

257) Tomasz A., Drugeon H.B, de Lencastre H.M., Jabes D., McDougall L. e Bille J., 1989. New mechanism for methicillin resistance in Staphylococcus aureus: clinical isolates that lack the PBP 2a gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity. *Antimicrob Agents Chemother.* 33(11),1869-74.

258) Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H. e Swaminathan, B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing", *J. Clin. Microbiol*, 33, 2233-2239.

259) Tenover FC. 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Med.* 119:S3-S10.

260) Tsakris, A., Pournaras, S., Woodford, N., Palepou, M.F.I., Babini, G.S., Douboyas, J. & Livermore, D.M. 2000. Outbreak of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1290-1292.

261) Toleman, M.A., Simm, A.M., Murphy, T.A., Gales, A.C., Biedenbach, D.J., Jones, R.N. & Walsh, T.R. 2002. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-β-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme. *J. Antimicrob. Chemother*, 50, 673-679.

262) Turton J.F., Woodford N., Glover J., Yarde S., Kaufmann M.E. & Pitt T.L. 2006. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the *bla*OXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species*. J Clin Microbiol* 44:2974-2976.

263) Towner K.J. 2009. Acinetobacter: an old friend, but a new enemy. *The Journal of Hospital Infection*, 73, 355-363.

264) Tzouvelekis L.S., Markogiannakis A., Psichogiou M., Tassios P.T. & Daikos G.L. 2012. Carbapenemases in Klebsiella pneumoniae and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev*, 25(4), 682-707.

265) Teixeira A.B, Martins A.F., Barin J., Hermes D.M., Pitt C.P. & Barth A.L. 2013. First report of carbapenem-resistant Acinetobacter nosocomialis isolates harboring ISAba1-blaOXA-23 genes in Latin America. *J Clin Microbiol*, 51(8), 2739-41.

266) Usery J.B., Vo N.H., Finch C.K., Cleveland K.O., Gelfand M.S. & Self T.H. 2014. Evaluation of the Treatment of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Bacteremia. *Am J Med Sci,* Sep 17.

267) Vincent S., Minkler P., Bincziewski B., Etter L. & Shlaes D.M. 1992. Vancomycin resistance in Enterococcus gallinarum. *Antimicrob Agents Chemother*, 36(7), 392-9.

268) von Eiff C., Peters G. & Heilmann C. 2002. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. *Lancet Infect Dis,* 2(11), 677-85.

269) VanGuilder H.D., Vrana K.E. & Freeman W.M. 2008. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques* 44 (5), 619–626.

270) van Veen S.Q., Claas E.C. & Kuijper E.J. 2010. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *J Clin Microbiol,* 48(3), 900-7.

271) Veloo, A.C., Knoester, M., Degener, J.E. & Kuijper, E.J. 2011. Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionisation-time of flight mass spectrometry methods for the identification of clinically relevant anaerobic bacteria. *Clin Microbiol Infect* 17(10), 1501-6.

272) Veloo A.C., Elgersma P.E., Friedrich A.W., Nagy E. & van Winkelhoff AJ. 2014. The influence of incubation time, sample preparation and exposure to oxygen on the quality of the MALDI-TOF MS spectrum of anaerobic bacteria. *Clin Microbiol Infect,* 9.[Epub ahead of print].

273) Vlek A.L., Bonten M.J. & Boel C.H. 2012. Direct matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry improves appropriateness of antibiotic treatment of bacteremia. *PLoS One*, 7(3), 32589.

274) Weinstein M., Reller L.B., Murphy J.R. e Lichtenstein K.A. 1983. The clinical significance of positive blood cultures: a comprehensive analysis of 500 episodes of bacteremia and fungemia in adults. II.Clinical observations, with special reference to factors influencing prognosis, *Rev Infect Dis,* 5, 54-70.

275) Willey B.M., Jones R.N., McGeer A., Witte W., French G., Roberts R.B., Jenkins S.G., Nadler H. & Low D.E. 1999. Practical approach to the identification of clinically relevant Enterococcus species. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 34(3), 165-71.

276) Wolfe, J. & Bryant, G. 2001. Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects. *International Journal of Refrigeration*. 24, 438-450.

277) Willems R.J. & Bonten M.J. 2007. Glycopeptide-resistant enterococci: deciphering virulence, resistance and epidemicity. *Curr Opin Infect Dis*, 20(4), 384-90.

278) Williamson Y.M., Moura H., Woolfitt A.R., Pirkle J.L., Barr J.R., Carvalho Mda G., Ades E.P., Carlone G.M. & Sampson J.S. 2008. Differentiation of *Streptococcus pneumoniae* conjunctivitis outbreak isolates by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol*, 74(19), 5891-7.

279) Wolters M., Rohde H., Maier T., Belmar-Campos C., Franke G., Scherpe S. & Aepfelbacher M. & Christner M. 2011. MALDI-TOF MS fingerprinting allows for

discrimination of major methicillin-resistant Staphylococcus aureus lineages. I*nt J Med Microbiol,* 301(1), 64-8.

280) Wieser A., Schneider L., Jung J. & Schubert S. 2012. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). *Appl Microbiol Biotechnol*., 93(3), 965-74.

281) Wang L., Han C., Sui W., Wang M. & Lu X. 2013. MALDI-TOF MS Applied to indirect carbapenemase detection: a validated procedure to clearly distinguish between carbapenemase-positive and carbapenemase-negative bacterial strains. *Anal Bioanal Chem*, 405(15), 5259-66.

282) Wang W., Xi H., Huang M., Wang J., Fan M., Chen Y. & Shao H., Li X. 2014. Performance of mass spectrometric identification of bacteria and yeasts routinely isolated in a clinical microbiology laboratory using MALDI-TOF MS. *J Thorac Dis.,* 6(5), 524-33.

283) Witney A. A., Gould K.A., Pope C.F., Bolt F., Stoker N.G., Cubbon M.D., Bradley C.R., Fraise A., Breathnach A.S., Butcher P.D., Planche T.D. & Hinds J. 2014. Genome sequencing and characterization of an extensively drug-resistant sequence type 111 serotype O12 hospital outbreak strain of *Pseudomonas aeruginosa.* Clin Mic. Infect., 14.

284) WFCC 2014. Culture collections information worldwide. *WFCC, World federation for culture collections*. [Online]. Available: http://www.wfcc.info/ccinfo/statistics [Accessed in october 2014].

285) WDCM 2014. Culture Collections Information wordwide. (On line). WDCM, *World Data Center for Microorganism.* Available at: www.wfcc.info/ccinfo/statistics (Accessed in October 2014).

286) Yan, J.J., Hsueh, P.R., Ko, W.C., Luh, K.T., Tsai, S.H., Wu, H.M. & Wu, J.J. 2001.Metallo-β-lactamases in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother*, 45, 2224-2228.

287) Yong D., Toleman M.A., Giske C.G., Cho H.S., Sundman K., Lee K. & Walsh T.R. 2009. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in Klebsiella pneumoniae sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother*, 53, 5046-54.

288) Yang MA, Lee J, Choi EH & Lee HJ. 2011. Pseudomonas aeruginosa bacteremia in children over ten consecutive years: analysis of clinical characteristics, risk factors of multi-drug resistance and clinical outcomes. *J Korean Med Sci*., 26(5), 612-8.

289) Yaw L.K., Robinson J.O. & Ho K.M. 2014. A comparison of long-term outcomes after meticillin-resistant and meticillin-sensitive Staphylococcus aureus bacteraemia: an observational cohort study., *Lancet Infect Dis*., 29. S1473-3099(14)70876-X.

290) Ziha-Zarifi, I., Llanes, C., Köhler, T., Pechere, J.C. & Plesiat, P. 1999. In vivo emergence of multidrug-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing the active efflux system MexA-MexB-OprM. Antimicrob, *Agents Chemother*, 43, 287-291.

291) Zanella R.C., Valderato F. & Lovgren M. 1999. First confirmed case of a vancomycin-resistant Enterococcus faecium with VanA phenotype from Brazil: isolation from a meningitides case in São Paulo. *Microb Drug Resist*, 5, 159-62.

292) Zapun A., Contreras-Martel C. & Vernet T. 2008. Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance. *FEMS Microbiol Rev*, 32(2), 361-85.

293) Zhang R., Wang X.D., Cai J.C., Zhou H.W., Lv H.X., Hu Q.F. & Chen G.X. 2011. Outbreak of Klebsiella pneumoniae carbapenemase 2-producing K. pneumoniae with high qnr prevalence in a Chinese hospital. *J Med Microbiol*, 60(7), 977-82.

294) Zander E., Higgins P.G., Fernández-González A. & Seifert H. 2013. Detection of intrinsic blaOXA-51-like by multiplex PCR on its own is not reliable for the identification of Acinetobacter baumannii. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(2), 88-9.

295) Zecconi A. & Scali F. 2013. Staphylococcus aureus virulence factors in evasion from innate immune defenses in human and animal diseases., *Immunol Lett*, 150(1-2), 12-22.

296) Zhou C., Hu B., Zhang X., Huang S., Shan Y. & Ye X. 2014a. The value of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in identifying clinically relevant bacteria: a comparison with automated microbiology system. *J Thorac Dis,* 6(5), 545-52.

297) Zhou G, Guo S, Luo Y, Ye L, Song Y, Sun G, Guo L, Chen Y, Han L. & Yang J. 2014b. NDM-1-producing strains, family Enterobacteriaceae, in hospital, Beijing, China. *Emerg Infect Dis.,* 20(2):340-2.