

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

CÍNTIA FIRMO TEIXEIRA

**AVALIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA, CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E
GENOTÍPICA DE AMOSTRAS RELACIONADAS A IRAS EM UM HOSPITAL DE
GRANDE PORTE DA REGIÃO METROPOLITANA DE BELO HORIZONTE**

Belo Horizonte

2022

Cínthia Firmo Teixeira

**AVALIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA, CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E
GENOTÍPICA DE AMOSTRAS RELACIONADAS A IRAS EM UM HOSPITAL DE
GRANDE PORTE DA REGIÃO METROPOLITANA DE BELO HORIZONTE**

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Microbiologia do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de
Minas Gerais sob a orientação do Prof.
Dr. Caio Tavares Fagundes e Co-
orientação da Dra. Camila Pacheco
Silveira Martins da Mata.

Belo Horizonte

2022

043

Teixeira, Cínthia Firmo.

Avaliação epidemiológica, caracterização fenotípica e genotípica de amostras relacionadas a IRAS em um hospital de grande porte da região metropolitana de Belo Horizonte [manuscrito] / Cínthia Firmo Teixeira. – 2022.

95 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientação: Prof. Dr. Caio Tavares Fagundes. Coorientação: Dra. Camila Pacheco Silveira Martins da Mata.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Infecção Hospitalar. 3. Resistência Microbiana a Medicamentos. 4. *Klebsiella pneumoniae*. I. Fagundes, Caio Tavares. II. Mata, Camila Pacheco Silveira Martins da. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE **CINTHIA FIRMO TEIXEIRA**

Nº REGISTRO: **2020715303**

Às 09:00 horas do dia **05 de outubro de 2022**, reuniu-se, por via remota, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Camila Bernardo de Brito (Departamento de Bioquímica e Imunologia – ICB/UFMG) e Luciana Debortoli de Carvalho (Departamento de Ciências Biológicas / Universidade Estadual de Santa Cruz), Prof. Dr. Caio Tavares Fagundes – Orientador e Dra. Camila Pacheco Silveira Martins da Mata (Coorientadora), para julgar o trabalho final **“Avaliação epidemiológica, caracterização fenotípica e genotípica de amostras relacionadas a IRAS em um hospital de grande porte da região metropolitana de Belo Horizonte”**, da aluna **Cinthia Firmo Teixeira**, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Dr. Caio Tavares Fagundes - Orientador, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. A candidata tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da dissertação ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Belo Horizonte, 05 de outubro de 2022

Membros da banca:

Dra. Camila Bernardo de Brito

Profa. Dra. Luciana Debortoli de Carvalho

De acordo:

Prof. Dr. Caio Tavares Fagundes

(Orientador)

Dra. Camila Pacheco Silveira Martins da Mata
(Coorientadora)

Profa. Dra. Daniele da Glória de Souza
(Coordenadora do Programa de Pós-graduação
em Microbiologia)



Documento assinado eletronicamente por **Daniele da Glória de Souza, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 06/10/2022, às 13:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Caio Tavares Fagundes, Professor do Magistério Superior**, em 06/10/2022, às 13:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciana Debortoli de Carvalho, Usuário Externo**, em 06/10/2022, às 15:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Camila Bernardo de Brito, Usuária Externa**, em 07/10/2022, às 13:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Camila Pacheco Silveira Martins da Mata, Usuário Externo**, em 16/11/2022, às 15:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1743927** e o código CRC **887F14EF**.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos ao Prof. Caio, por quem tenho grande admiração, pela orientação e (muita) paciência em acompanhar meu trabalho durante um período particularmente caótico.

À minha co-orientadora Dra. Camila Pacheco, por estar sempre disponível para lidar com os muitos desafios que enfrentamos ao mesmo tempo que se dedica a sua linda família e aos muitos projetos que se envolve.

À Profa. Dani e Profa. Mila por me acolher em seu laboratório, compartilhar seu conhecimento e estar sempre disponível para qualquer assunto ou jogar conversa fora. À Frank, que me fazia companhia cedo pela manhã, por todo apoio técnico e estar sempre disponível para ouvir e ajudar com a bendita biologia molecular.

Aos colaboradores Ms. Uener e Dra. Silvia que colaboraram enormemente com as análises epidemiológicas e caracterização genética dos isolados.

Aos amigos e colegas com quem compartilhei angústias, risadas, abraços, café, experiências e experimentos. Anninha, Ana Carol, Bárbara, Brenda, Bruno, Carla, Camila, Carlos, Clarinha, Diego, Giu, Judeu, Karen, Madu(ela), Marina, Rafa e Rafa, Raquel, Renanzinho, Samantinha e Thales. Em especial, ao Matheus que desde o meio do semestre me acompanhou durante os momentos mais caóticos. Sem você, tudo teria sido mais difícil e sem graça.

À toda equipe dos laboratórios de Interação Microrganismo Hospedeiro e Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos cujo suporte em tempos tão sombrios para a ciência nacional tornou essa pesquisa possível.

Agradeço a todos meus amigos e familiares pelo apoio para que eu pudesse concluir meu trabalho.

Por fim e, de forma alguma menos importante, aos meus pais pelo apoio incondicional. Não tenho palavras para expressar minha gratidão. Graças ao amor e dedicação de vocês, eu tenho o privilégio de poder me dedicar a algo que eu tanto gosto que é a pesquisa.

RESUMO

As infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) configuram um grave problema de saúde pública em âmbito mundial, especialmente em países de média e baixa renda. Nesse contexto, a resistência a antimicrobianos (RAM) apresenta-se como uma realidade emergente e preocupante, ao limitar as opções de tratamento e aumentar, consequente, as taxas de morbidade e mortalidade. No ano de 2019, o HRTN foi um retrato do cenário mundial quanto à situação de IRAS e a MDR, colocando em evidência e reafirmando a importância da família *Enterobacteriaceae*. Nesse sentido, os Centros de Terapia Intensiva representam, portanto, um setor de grande importância ao albergar um maior tempo de internação e impactar significativamente na frequência de óbitos. Ao caracterizar isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* multidroga-resistente oriundos do CTI, a diversidade genética e a presença disseminada do gene móvel de resistência *bla_{KPC}* em todas as amostras, ressaltam a importância dessa bactéria em IRAS e na emergência de multirresistência. Diante desse cenário, o foco norteador do presente trabalho foram as terapias direcionadas ao hospedeiro como uma alternativa ao uso exclusivo de antimicrobianos, visto que estudos promissores demonstraram o emprego de moléculas que promovem a ativação de mecanismos imunes inatos de modo a sensibilizar bactérias multidroga-resistentes a antimicrobianos. À vista disso, o trabalho se propôs estudar o envolvimento do metabolismo de triptofano, cujos metabólitos desempenham papéis já descritos na imunomodulação, em macrófagos na sensibilização a imipenem de amostras de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenêmicos (KPC) isoladas de pacientes acometidos por IRAS e internados do CTI do HRTN em 2019. Para isso, macrófagos derivados de medula óssea de camundongos selvagens, ativados ou não com LPS e IFN γ , e deficientes para enzima IDO1 foram caracterizados e desafiados com isolados clínicos por diferentes tempos, na presença ou ausência de imipenem. Constatou-se que um dos isolados foi ressensibilizado ao antimicrobiano em células selvagens e esse fenômeno independentemente da ativação celular prévia e dependente da expressão de IDO1.

Palavras-chave: Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde, Resistência antimicrobiana, *Klebsiella pneumoniae*, Terapias Direcionadas ao Hospedeiro.

ABSTRACT

Healthcare-associated infections (HAI) are a serious public health problem worldwide, especially in low- and middle-income countries. In this context, antimicrobial resistance presents itself as an emerging and worrying reality, as it limits treatment options and, consequently, increases morbidity and mortality rates. In 2019, the Hospital Risoleta Tolentino Neves portrayed the world scenario regarding the situation of HAI and antimicrobial resistance, highlighting and reassuring the importance of the *Enterobacteriaceae* family. In this sense, the Intensive Care Units represent an environment of great importance as they accommodate a longer hospitalization time and significantly impact the frequency of deaths within the hospital. When characterizing clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from the ICU, the genetic diversity and the widespread presence of the mobile resistance gene *bla_{KPC}* in all samples emphasized the importance of this bacterium in the face of HAI and in the emergence of multidrug resistance. Given this scenario, the present work aimed to approach host-directed therapies as an alternative to the exclusive use of antimicrobials, since promising studies have demonstrated the use of molecules that promote the activation of innate immune mechanisms to resensitize multidrug-resistant bacteria. Thus, the present work focused on studying tryptophan metabolism, which metabolites play roles already described in immunomodulation, in the sensitization to imipenem of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* (KPC) samples isolated from patients affected by HAI in an in vitro infection model with macrophages. Therefore, macrophages derived from the bone marrow of wild-type mice, activated or not with LPS and IFN γ , and deficient for the IDO1 enzyme were characterized and challenged with clinical isolates at different time points, in the presence or absence of imipenem. It was found that one of the isolates was resensitized to the antimicrobial in wild-type cells and this phenomenon occurred independently of previous cell activation, and dependently on the expression of IDO1.

Key-words: Healthcare-associated Infections, Antimicrobial resistance, *Klebsiella pneumoniae*, Host-Directed-Therapies.

LISTA DE ABREVIações E SÍMBOLOS

% v/v– concentração em porcentagem volume por volume

°C– graus Celsius

μL- Microlitro

μm– Micrometro

μM- Micromolar

AHR- Receptor de hidrocarbonetos aromáticos

AMR– (do inglês, *Antimicrobial resistance*)

AMS- Assembleia Mundial da Saúde

ANVISA– Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BHI - (do inglês, *Brain Heart Infusion*)

BMDM – (do inglês, *Bone Marrow Derived Macrophages*)

bp – (do inglês, *base pairs*)

CCIH- Comissões de Controle de Infecção Hospitalar

CDC– (do inglês, *Centers for Disease Control and Prevention*)

CO₂– Dióxido de carbono

COEP- Comitê de Ética e Pesquisa

CRE- *Enterococcus* resistente à vancomicina

CTI- Centro de Terapia Intensiva

CVC- Cateter venoso central

DMSO- Dimetil Sulfóxido

dNTP- Desoxirribonucleotídeo trifosfatado

ECDC– (do inglês, *European Centre for Disease Prevention and Control*)

ELSB- β-lactamases de amplo espectro

ESBL-PE- *Enterobacteriaceae* produtoras de β-lactamases de amplo espectro

ESCAPE- *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridioides difficile*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacteriaceae*

ESC-R- Enterobactérias resistentes a carbapenêmicos

ESCs- Fluoroquinolonas e cefalosporinas de espectro estendido

ESKAPE- *E. faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* e *Enterobacter spp.*

FUNDEP- Fundação de Desenvolvimento da Pesquisa

h- hora

HCIAs- (do inglês, *Healthcare-associated infections*)

HDT- Terapia direcionadas ao hospedeiro

HRTN- Hospital Risoleta Tolentino Neves

IDO1- Idolamina-2,3-dioxigenase 1

IFN-γ – Interferon gamma

IH- Infecções hospitalares

IPCS- Infecção Primária da Corrente Sanguínea associada ao cateter venoso central

IRAS- Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde

ISC- Infecção de sítio cirúrgico

ITU- Infecção do Trato Urinário

KPC- *Klebsiella pneumoniae* Produtora de carbapenemase

L- Litro

LB – Luria Bertani

LDH – Desidrogenase láctica

MDR- Multirresistência a antimicrobianos

mg- micrograma

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

MIC- Concentração Inibitória Mínima

min- Minuto

mL- Mililitro

MRSA- *S. aureus* resistentes à meticilina

NAD- Dinucleótido de nicotinamida e adenina

NADP- Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

NEPE- Núcleo de Ensino e Pesquisa e Extensão

NHSH- (do inglês, *National Healthcare Safety Network*)

ng - Nanograma

nm- Nanômetro

nM – Nanomolar

OD – (do inglês, *optical density*)

OMS- Organização Mundial da Saúde

PAV- Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica

PBS- Solução tampão fosfato-salino

PMA –Phorbol-12-myristate-13-acetate

PNPCIRAS- Programa Nacional de Prevenção e Controle das Infecções relacionadas à Assistência à Saúde

RAM- Resistência a antimicrobianos

rpm- Rotações por minuto

ROS – (do inglês, *Reactive Oxygen Species*)

SCIH- Serviço de Controle de Infecção Hospitalar

SFB – Soro Fetal Bovino

TAE – Tris-Acetato-EDTA

TCDD- Tetraclorodibenzo-p-dioxina

TDO- Triptofano 2,3-dioxigenase

TRP- Triptofano

UFC- Unidade Formadora De Colônia

UFMG- Universidade Federal de Minas Gerais

USP- Universidade de São Paulo

UTI- Unidade de Terapia Intensiva

VISA- *S. aureus* com resistência intermediária e resistentes à vancomicina

VRE- *Enterococcus* resistente à vancomicina

VRSA- *S. aureus* resistentes à vancomicina

WHO– (do inglês, *World Health Organization*)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Vias de metabolismo do triptofano

Figura 2 - Representação esquemática do fluxo de trabalho do ensaio para determinação da percentagem de macrófagos (ativados ou não) com bactérias fagocitadas

Figura 3 - Representação esquemática do fluxo de trabalho do ensaio para determinação da taxa fagocitose e recuperação de *K. pneumoniae* fagocitadas por macrófagos ativados ou não

Figura 4 - Representação esquemática do fluxo de trabalho do ensaio para determinação das taxas de interferência na susceptibilidade de linhagens de interferência e isolados clínicos MDR de *K. pneumoniae* a imipenem em macrófagos (ativados ou não)

Figura 5 - Diversidade microbiana dos isolados clínicos no HRTN por setores e andares

Figura 6 - Associação entre o gênero dos isolados e desfecho clínico dos pacientes expresso em percentual

Figura 7 - Frequência de MDROs e perfis de resistência de isolados de pacientes no Hospital (A) e no CTI (B). E perfis de resistência dos quatro MDROs mais frequentes no hospital (C,E,G e I) e CTI (D, F, H e J)

Figura 8 - Produtos da amplificação do gene de resistência blaKPC dos isolados clínicos de *K. pneumoniae* e linhagens de referência ATCC 700603 (A70) e ATCC 13883 (A13), e padrão molecular de 100 bp (P). A banda referente ao gene blaKPC está indicado em vermelho

Figura 9 – Produtos da amplificação dos isolados clínicos de *K. pneumoniae* e linhagens de referência ATCC 700603 (A70) e ATCC 13883 (A13), por ERIC-PCR e padrão molecular de 100bp (P). Todas as bandas analisadas estão indicadas em vermelho

Figura 10 - Filogenia dos isolados clínicos e linhagens referência de *K. pneumoniae* ATCC 13883 (A13) a partir da técnica de ERIC-PCR

Figura 11 - Avaliação da atividade fagocítica de BMDM infectados com *K. pneumoniae* ATCC 13883 a um MOI de 5 e/ou 10, com tempos de fagocitose de 15 e/ou 30 min.

Figura 12 - Avaliação da produção de ROS por células BMDM (A, B e C) e M-THP-1 (D, E e F) ativadas (activated) ou não (resting) por citometria de fluxo. A análise estatística foi realizada através do teste t de Student (B, C, E e F). Valores de $*p < 0,05$ foram estatisticamente significativos.

Figura 13 - Avaliação da viabilidade celular (A e B) e expressão de marcadores de superfície de células ativadas ou não, apresentada em percentual de células marcadas (C, E, G e I) e MFI (D, F, H e J). A análise estatística foi realizada através do teste t de Student e valores de $*p < 0,05$ foram estatisticamente significativos.

Figura 14 - Avaliação da atividade fagocítica e killing de BMDM ativados e/ou não, infectados com *K. pneumoniae* ATCC 13883 a um MOI de 10, com fagocitose de 30 min, acompanhadas até 2h

Figura 15 - Avaliação da atividade fagocítica de BMDM e M-THP-1 ativados e/ou não infectados com *K. pneumoniae* ATCC 13883 a um MOI de 5 e/ou 10, com tempos de fagocitose de 30 min acompanhadas até 2h.

Figura 16 - Avaliação da expressão de marcadores de superfície por citometria de fluxo de células BMDM WT e IDO1^{-/-} não ativadas. A análise estatística foi feita por Multiple t-test, valores de $\#p < 0,05$ foram estatisticamente significativos.

Figura 17 - Determinação da taxa fagocitose e recuperação de *K. pneumoniae* fagocitadas por macrófagos. A análise estatística foi realizada através do teste ANOVA one way. Valores de $*p < 0,05$ foram estatisticamente significativos em comparação à mesma linhagem celular sem imipem. $\#p < 0,05$ foram significativos em comparação a CFU/ml da mesma linhagem em D.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização da população de estudo no hospital e CTI

Tabela 2 - Associação entre o gênero dos isolados e o desfecho clínico dos pacientes

Tabela 3 - Associação entre o perfil de resistência a antimicrobianos-chave e desfecho clínico dos pacientes do hospital

Tabela 4 - Associação entre o perfil de resistência a antimicrobianos-chave e o desfecho clínico dos pacientes do CTI

Tabela 5 - Descrição dos Isolados de escolha

Tabela 6 - Caracterização fenotípica das amostras por testes bioquímicos

Tabela 7 - Caracterização fenotípica das amostras por testes de suscetibilidade a antimicrobianos

SUMÁRIO

1 JUSTIFICATIVA	18
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 IRAS: Panorama geral	20
2.1.2 Legislações em IRAS	23
2.2 Fármacos antimicrobianos e resistência antimicrobiana: panorama atual	24
2.3 Microrganismos prevalentes em IRAS	27
2.4 Enterobactérias	31
2.4.1 Enterobacteriaceae produtoras de β -lactamases de amplo espectro	31
2.4.2 Enterobacteriaceae Resistentes a Carbapenêmicos	32
2.4.3 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	33
2.5 Terapias direcionadas ao hospedeiro	35
2.5.1 O metabolismo de triptofano como alvo para HDTs	38
3 OBJETIVOS	41
3.1 Objetivo geral	41
3.1.1 Objetivos específicos	41
4 METODOLOGIA	42
4.1 Aspectos Éticos	42
4.2 Avaliação situacional de IRAS	42
4.2.1 Local de Estudo	42
4.2.2 Obtenção e Análise de Dados	42
4.3 Montagem do Biobanco de Isolados Clínicos e Amostragem	44
4.4 Caracterização Fenotípica dos Isolados Clínicos alvo e linhagens de	45

4.5 Caracterização Genética dos Isolados Clínicos alvo e linhagens de referência	46
4.5.1 Extração do DNA Bacteriano	46
4.5.2 Amplificação de Sequências Consenso-Intergênicas Repetitivas de.....	47
4.5.3 Amplificação de genes de resistência blaKPC	48
4.6 Animais	49
4.7 Macrófagos: Origem e Obtenção	49
4.8 Ativação de macrófagos	50
4.9 Avaliação da viabilidade celular	50
4.10 Avaliação da produção de ROS e expressão de marcadores de superfície .	51
4.11 Preparo do Inóculo	52
4.12 Determinação da porcentagem de macrófagos com bactérias fagocitadas ..	52
4.13 Determinação da taxa fagocitose e recuperação de <i>K. pneumoniae</i> fagocitadas por macrófagos ativados ou não	53
4.14 Determinação das taxas de interferência na susceptibilidade de linhagens de	54
4.15 Análise estatística	55
5 RESULTADOS	55
5.1 Avaliação situacional de IRAS	55
5.1.1 Caracterização da população de estudo	55
5.1.2 Distribuição de microrganismos isolados por setor do HRTN	57
5.1.3 Caracterização da população de estudo quanto ao gênero dos microrganismos	58
5.1.4 Distribuição dos perfis de resistência entre microrganismos multidroga-resistentes (MDROs) isolados em todo o HRTN e no CTI	60

5.1.5 Caracterização da população de estudo quanto ao perfil de resistência dos	62
5.2 Montagem do biobanco de isolados clínicos multidroga-resistentes e seleção	62
5.3 Caracterização dos isolados clínicos de escolha e linhagens de referência ...	64
5.3.1 Descrição dos isolados clínicos segundo o laboratório de microbiologia..	64
5.3.2 Caracterização fenotípica dos isolados clínicos e linhagens de referência por testes bioquímicos	65
5.3.3 Caracterização fenotípica dos isolados clínicos e linhagens de referência	66
5.3.4 Caracterização genética dos isolados clínicos e linhagens de referência.	67
5.4 Padronização dos ensaios de infecção com isolados clínicos de escolha e ...	69
5.4.1 Escolha do inóculo de <i>K. pneumoniae</i> e tempo de fagocitose para os	69
5.4.2 Avaliação do protocolo de ativação com IFN γ e LPS e efeito na fagocitose	70
5.5 Determinação das taxas de interferência na susceptibilidade de isolados.....	72
6 DISCUSSÃO	76
7 CONCLUSÃO.....	80
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
ANEXO I – Parecer CEP	90

1 JUSTIFICATIVA

As infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), ainda que não recebam a atenção pública devida, constituem um grave problema de saúde pública, devido à sua alta morbimortalidade no cenário mundial (ANVISA, 2016a,b). Conceitua-se IRAS como sendo toda infecção constatada ou em incubação no ato de admissão do paciente neonato, adulto ou pediátrico, em uma unidade de assistência à saúde, desde que não haja evidências de infecção anterior (BRASIL, 1998; CDC, 2019a).

A prevalência dessas infecções é cerca de 3 vezes maior em países de baixa e média renda, enquanto o tempo de hospitalização pode ser até 6 vezes maior, em comparação a países de alta renda, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS). Fatores como a escassez de recursos, uso prolongado e inapropriado de antimicrobianos e ausência de políticas nacionais de controle, prevenção e vigilância podem justificar maior prevalência de IRAS em tais países (WHO, 2014b, WHO, 2009).

Nesse contexto, a resistência a antimicrobianos (RAM) tem se tornado um fator preocupante e crescente em âmbito mundial. Ao prolongar o tempo de hospitalização, a probabilidade de um microrganismo tornar-se resistente aumenta, limitando as opções de tratamento e aumentando, consequentemente, as taxas de morbidade e mortalidade, bem como os riscos associados a procedimentos médicos complexos (WHO, 2015a).

No tocante aos microrganismos resistentes e multirresistentes, a OMS aponta para a relevância de representantes da família *Enterobacteriaceae* em IRAS. Dentre os quais destacam-se *Enterobacteriaceae* Resistentes a Carbapenêmicos (CRE), *Enterobacteriaceae* produtoras de β -lactamases de amplo espectro (ELSB), o grupo CESP e alguns representantes do grupo ESKAPE (WHO, 2014a).

O combate à prevalência de IRAS, em especial àquelas causadas por enterobactérias multirresistentes constituem um cenário desafiador, dado o grande vácuo observado na descoberta de novas classes de antimicrobianos nas últimas três décadas e a dificuldade enfrentada no desenvolvimento de novos antimicrobianos para o tratamento de infecções causadas por bactérias entéricas Gram-negativas (WHO, 2014a).

Ainda que o desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos seja de grande importância, o uso exclusivo desses agentes não tem se mostrado eficaz no combate à crescente incidência de RAM (STOCKS *et al.*, 2018; MAEURER *et al.*, 2016). Nesse sentido, as terapias direcionadas ao hospedeiro (HDTs), cujo alvo não é o patógeno em si, se apresentam como uma promissora alternativa terapêutica a ser empregada como adjuvante a tratamentos canônicos, por ser menos propensa à resistência terapêutica, em comparação a métodos que tem o patógeno como alvo direto (KAUFMANN *et al.*, 2017).

As HDTs utilizam de pequenas moléculas capazes de modular a resposta imune do hospedeiro, interferindo em fatores celulares necessários para a replicação e persistência do patógeno, aumentando os mecanismos efetores contra o mesmo e regulando, ainda, fatores que podem levar à resposta inflamatória exacerbada (KAUFMANN *et al.*, 2017). À vista disso, o catabolismo de triptofano (TRP) apresenta-se como potencial candidato a alvo para HDTs, uma vez que muitos metabólitos de TRP podem atuar na regulação das respostas imune inata e adaptativa (BESSEDE *et al.*, 2014; GUTIÉRREZ-VÁZQUEZ; QUINTANA, 2018). O triptofano (TRP) é um dos nove aminoácidos denominados essenciais. Sendo o corpo humano incapaz de sintetizá-los, o fornecimento desses aminoácidos prove da dieta (HUBBARD *et al.*, 2015). O metabolismo do TRP pode ocorrer por três vias catabólicas diferentes, sendo que cerca de 95% do catabolismo de todo triptofano ingerido ocorre pela via das quinureninas, a partir da atividade da enzima indolamina-2,3-dioxigenase (IDO), principalmente a isoforma IDO1. Após a absorção pelas células epiteliais intestinais, o aminoácido alcança o sistema porta-hepático, para então ser catabolizado pela enzima triptofano 2,3-dioxigenase (TDO) encontrada nos hepatócitos. Em seguida, o TRP não utilizado é liberado na corrente sanguínea e, ao atingir tecidos periféricos, catabolizado pela IDO1, expressa em células epiteliais intestinais, células dendríticas e, principalmente, em macrófagos (TALEB *et al.* 2019; DEHHAGHI *et al.*, 2019).

O AHR é um fator de transcrição altamente conservado que possui um domínio de ligação ao ligante, com o qual múltiplas classes de compostos exógenos e endógenos podem interagir. Uma vez translocado para o núcleo celular, o AHR é responsável pela transcrição de genes expressos durante a resposta inflamatória, durante a

angiogênese e genes que codificam a bateria de enzimas que metabolizam compostos exógenos (GUTIÉRREZ-VÁZQUEZ; QUINTANA, 2018; HUBBARD *et al.*, 2015; MOURA-ALVES *et al.*, 2014;).

Interessantemente, estudos recentes têm explorado o emprego de HDTs para induzir a sensibilização de microrganismos multirresistentes, nos quais demonstrou-se que a ativação de mecanismos efetores da resposta imune por HDT em combinação com antibióticos é capaz de contornar a resistência em bactérias multirresistentes. Nesse sentido, a hipótese norteadora do presente projeto prevê que o metabolismo de TRP poderia interferir na infecção por bactérias multirresistentes por meio da inibição das respostas antimicrobianas de leucócitos e consequente interferência na sensibilização de microrganismos multirresistentes (REKHA *et al.*, 2020).

Dessa forma, o objetivo do presente projeto é avaliar o envolvimento do metabolismo de triptofano em macrófagos na sensibilização de isolados bacterianos multirresistentes provenientes pacientes do Hospital Risoleta Tolentino Neves acometidos por IRAS. A fim de definir a amostra alvo do estudo, uma avaliação da ocorrência, distribuição e perfil de resistência de bactérias a antimicrobianos no hospital em questão foi conduzida. Posteriormente, diferentes linhagens de macrófagos selvagens e deficientes para IDO1, pré-ativados ou não, foram caracterizados e avaliados quanto à sua atividade fagocítica de *killing* frente à infecção isolados clínicos multidroga-resistentes por diferentes tempos, na presença ou ausência de imipenem.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 IRAS: Panorama geral

As infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) são um grave problema de saúde pública devido à sua alta morbimortalidade no cenário mundial (ANVISA, 2016a, b). O termo IRAS empregado atualmente substitui o que antes denominava-se

infecções hospitalares (IH), e engloba diferentes ambientes de assistência à saúde, não somente hospitalares.

A Portaria 2.616/98 da ANVISA assume o conceito de infecção hospitalar adotado pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) como sendo toda infecção constatada ou em incubação no ato de admissão do paciente neonato, adulto ou pediátrico, em uma unidade de assistência à saúde, desde que não haja evidências de infecção anterior (BRASIL, 1998; CDC, 2019a). Em linhas gerais, os critérios para o diagnóstico de infecção hospitalar em pacientes adulto e pediátrico podem ser resumidos nas seguintes circunstâncias:

- Toda manifestação clínica até 72h pós-internação, quando o período de incubação do microrganismo é desconhecido e evidências clínicas e dados laboratoriais inexistentes no ato da admissão.
- Quando associada a procedimentos terapêuticos e diagnósticos durante o período de 72h.
- Quando se isola um microrganismo diferente em uma mesma topografia na qual diagnosticou-se uma infecção comunitária, mediante agravamento das condições clínicas do paciente.

Infecções em neonatos, por sua vez, são classificadas como hospitalares desde que não transmitidas de forma transplacentária e associadas à bolsa rota superior a 24 horas. Ademais, em outros países, que não o Brasil, alguns autores adotam o período de 48 horas a partir da admissão do paciente como critério diagnóstico para classificação de IRAS (REVELAS, 2012).

Ainda que não recebam a atenção pública devida, milhões de pacientes são afetados por IRAS anualmente em escala global, acarretando gastos suntuosos para os sistemas de saúde e altos custos para o paciente e familiares. Ao prolongar o tempo de hospitalização, tais infecções podem favorecer a disseminação da resistência a drogas antimicrobianas e comprometer a qualidade de vida do paciente, resultando em consequências incapacitantes e mortes desnecessárias.

O tempo de hospitalização associado a IRAS varia entre 5 a 29,5 dias em países em desenvolvimento (WHO, 2014b, WHO, 2009). No Brasil, estima-se 5 dias adicionais

por paciente em virtude de infecções hospitalares. Para um gasto aproximado de R\$30,00 por internação hospitalar, o Sistema Único de Saúde (SUS) arca com aproximadamente R\$120 milhões por ano. Considerando os milhões de brasileiros usuários da rede privada de assistência à saúde, um estudo aponta para um valor estimado de R\$ 5 bilhões em gastos com infecções hospitalares (CREMESP, 2010).

Os altos custos para a saúde também são observados em países de alta renda, como aponta a OMS por meio de relatório divulgado em 2011. Nos Estados Unidos, o gasto anual associado às IRAS foi de aproximadamente US\$ 6,5 bilhões, em 2004. Estudos mais recentes calculam entre U\$28.4 e U\$33.8 bilhões em gastos, em 2007 (SCOTT, 2009), enquanto em países europeus, a estimativa em 2002 foi de €7 bilhões, segundo relatório da OMS (WHO, 2011) e €5,5 bilhões em 2009, de acordo com o Centro Europeu para Prevenção e Controle de Doenças (ECDC, do inglês, *European Centre for Disease Prevention and Control*) (ECDC, 2009).

Esse problema endêmico de saúde pública assola países desenvolvidos e em desenvolvimento em diferentes proporções. A cada 100 pacientes hospitalizados, estima-se que 7 virão a desenvolver pelo menos uma IRAS em países desenvolvidos, contra 10 em países em desenvolvimento, em um dado período. A prevalência dessas infecções varia entre 5,7% em países de alta renda e 19,1% em países em baixa e média renda, segundo estimativas divulgadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (WHO, 2009; ALLEGIANZI *et al.*, 2011).

Na América Latina, Ásia e África, estudos apontam para um excesso de mortalidade em pacientes adultos ocasionadas por Infecção do Trato Urinário (ITU) associada ao uso de cateter (18,5%), Infecção Primária da Corrente Sanguínea (IPCS) associada ao uso de cateter venoso central (CVC) (23,6%) e Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica (PAV) (29,3%) (WHO, 2009). Além das topografias associadas às IRAS mencionadas anteriormente, a OMS destaca ainda infecções de sítio cirúrgico (ISC). Estima-se que um a cada três pacientes operados apresentarão ISC em países em desenvolvimento, valor esse até nove vezes maior que em países desenvolvidos (WHO, 2014b).

A gravidade das IRAS ganha maior dimensão em grupos de maior risco, como pacientes admitidos em unidades de terapia intensiva e neonatos. Em países de baixa e média renda, a frequência de infecções adquiridas em unidades de terapia intensiva (UTIs) são de duas a três vezes maior que em países de alta renda. O risco de infecção em neonatos, por sua vez, é de três a vinte vezes maior em países em desenvolvimento (WHO, 2014b).

No Brasil, em pesquisa realizada pela ANVISA em parceria com a Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (USP), informações foram coletadas de 4.148 hospitais entre os anos de 2001 e 2003. As principais topografias associadas às IRAS em UTIs de adulto no país foram: sistema respiratório (48%), trato urinário (20%), corrente sanguínea (14%), cutânea (6%) e outras (12%) (ANVISA, 2016b).

Muitos são os potenciais fatores determinantes para a maior prevalência de IRAS em países em desenvolvimento, dentre os quais ressaltam-se: a escassez de recursos, resultando em condições sanitárias e de higiene precárias; uso prolongado e inadequado de antimicrobianos e aparatos invasivos; falta de conhecimento quanto a práticas básicas de controle de infecção; ausência de políticas nacionais de controle, prevenção e vigilância de IRAS (ALLEGRI *et al.*, 2011).

2.1.2 Legislações em IRAS

O histórico de medidas normativas para o controle e prevenção de IRAS no Brasil tem como principal marco a Portaria MS 196, criada em 1983, que determinava a criação de um órgão específico para prevenir e controlar infecções hospitalares em todos os hospitais brasileiros, dando origem às Comissões de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH). Em substituição à portaria vigente, a Portaria 930, em 1992, trata da necessidade de manutenção das CCIHs e dos Serviços de Controle de Infecção Hospitalar (SCIHs) (ANVISA, 2004). A edição da Lei Federal nº 9.431, em 1997, sancionou a obrigatoriedade da manutenção de um Programa de Controle de Infecções Hospitalares (PCHI) em hospitais de todo país. No ano seguinte, a Portaria nº 2616 estipulou as diretrizes e normas para a prevenção e o controle das infecções

hospitalares, tratando ainda da composição, serviços e competências das CCIHs (ANVISA, 2004).

Em 2013, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) divulgou a primeira versão do Programa Nacional de Prevenção e Controle das Infecções relacionadas à Assistência à Saúde (PNPCIRAS). O documento apresenta dados e informações acerca da situação das IRAS em ambiente nacional e trata da obrigatoriedade, por parte de todos os serviços de saúde com qualquer número de leitos, da notificação mensal à Anvisa de IPCS relacionadas ao uso de CVC em UTI, de marcadores de resistência microbiana relacionados a estas infecções e de ISC relacionadas ao parto cirúrgico (ANVISA, 2016b). A segunda versão do PNPCIRAS, vigente dos anos de 2016 a 2020, incluiu à lista de indicadores de notificação compulsória os dados de PAV e de ITU associadas à sonda vesical de demora (ARAÚJO *et al.*, 2018).

Em 2017, a ANVISA, em resposta à Assembleia Mundial da Saúde (AMS) de 2015, divulgou o Plano Nacional de Prevenção e Controle de Resistência Microbiana em Serviços de Saúde, formulado com base no objetivo maior do Plano de Ação proposto pela OMS de definir estratégias nacionais para detecção, prevenção e redução da resistência microbiana em serviços de saúde no país (WHO, 2015a,b; ARAÚJO *et al.*, 2018; ANVISA, 2017). O Plano Nacional subdivide-se em planos estratégico, operacional e de monitoramento a serem executados em 5 anos, com avaliação anual para possíveis ajustes. As estratégias propostas englobam diferentes campos da vigilância sanitária, como alimentos, serviços de saúde e laboratórios, bem como instâncias federais, estaduais, distritais, municipais e locais de controle de infecção hospitalar (ANVISA, 2017).

2.2 Fármacos antimicrobianos e resistência antimicrobiana: panorama atual

Ainda no contexto de controle, prevenção e vigilância de IRAS, a resistência a antimicrobianos (RAM) tem se tornado um problema crescente em âmbito mundial. Quando um microrganismo se torna resistente, as opções de tratamento são reduzidas, prolongando o tempo de hospitalização, aumentando a taxa de mortalidade e os riscos a pacientes submetidos a procedimentos médicos complexos. Consequentemente os custos para os sistemas de saúde são alavancados,

comprometendo o desenvolvimento socioeconômico de um país, diante da consequente perda da produtividade da população (WHO, 2015a).

Em linhas gerais, a resistência a antimicrobianos (RAM) é um fenômeno de ocorrência natural em microrganismos que lhes confere a adaptabilidade necessária para sobreviver e crescer em novos ambientes, na presença de substâncias antimicrobianas. A resistência desenvolvida por um microrganismo em determinado sítio pode espalhar-se rapidamente e de maneira imprevisível para diferentes sítios por meio de trocas de material genético entre a mesma ou diferentes populações. Microrganismos resistentes podem, ainda, circular entre seres humanos e animais através de alimentos, água e pelo ambiente (WHO, 2014a, 2015a).

Ao controlar o crescimento microbiano, antimicrobianos criam uma pressão seletiva sobre uma comunidade de microrganismos, de modo a selecionar aqueles capazes de sobreviver em sua presença. O uso indevido e extenso desses agentes intensifica e acelera tal pressão seletiva, induzindo uma resposta adaptativa mais intensa e rápida por parte da comunidade a eles submetida (DOMINGUES *et al.*, 2012; WHO, 2014a).

A crescente incidência global de RAM tem sua raiz no uso extenso e desnecessário de antimicrobianos, agravada pelo tamanho da população humana mundial e a atual facilidade de locomoção, o que viabiliza a disseminação de patógenos resistentes em escala global. Do ponto de vista clínico, as causas humanas para a atual crise de RAM no mundo incluem a prescrição de antimicrobianos com base somente em dados epidemiológicos e não em testes laboratoriais, a descontinuação do tratamento e o acesso a medicamentos sem prescrição médica (DOMINGUES *et al.*, 2012). A esse respeito, a OMS aponta ainda para regulamentações insuficientes quanto ao controle do uso e acesso de tais agentes, a inexistência de programas de controle e prevenção de infecções e a precariedade laboratorial e dos sistemas de vigilância (WHO, 2015b).

No tocante ao crescente problema mundial de IRAS, outro tema igualmente importante refere-se às infecções causadas por microrganismos multirresistentes. Ainda que a definição de multirresistência a antimicrobianos (do inglês, *MDR*) não encontre consenso entre a comunidade científica e órgãos fiscalizadores, segundo a

Anvisa, um microrganismo é tido como multirresistente quando apresenta resistência a duas ou mais classes de antimicrobianos (ANVISA, 2016a).

Fármacos antimicrobianos podem ser classificados quanto a sua estrutura molecular, mecanismo de ação e espectro de atividade antimicrobiana. Outra categorização possível considera a origem desses agentes, sendo aqueles produzidos por microrganismos denominados antibióticos e os demais sintetizados artificialmente, sintéticos. Não surpreendentemente, a fim de se aumentar a eficácia de determinados antibióticos, muitos passaram por modificações sintéticas, originando antibióticos semissintéticos (MADIGAN *et al.*, 2016).

De forma concisa, dentre as classes de fármacos antimicrobianos sintéticos, as sulfas são agentes bacteriostáticos e inibem o crescimento bacteriano ao interferirem na síntese de ácidos nucleicos. As quinolonas, por sua vez, são bactericidas, provocando a morte bacteriana ao inibir a atividade da enzima DNA-girase, fundamental no processo de superenovelamento do DNA bacteriano (MADIGAN *et al.*, 2016).

As polimixinas compreendem outra categoria de antimicrobianos sintéticos bactericidas. São lipopeptídeos catiônicos que promovem o aumento da permeabilidade da membrana externa de bactérias Gram-negativas ao interagir com polissacarídeos (TRIMBLE *et al.*, 2016).

Quanto às classes de antibióticos, os β -lactâmicos são inibidores da síntese de parede celular bacteriana e compartilham estruturalmente o anel β -lactâmico, o que lhes conferem o nome e a atividade bactericida. São representantes dessa classe as penicilinas naturais e semissintéticas, como as cefalosporinas, os carbapenêmicos e monobactâmicos. Em conjunto, os β -lactâmicos correspondem a mais da metade de todos os antibióticos produzidos e utilizados no mundo (MADIGAN *et al.*, 2016).

Outra classe de antibióticos que atua na inibição da síntese de parede celular em bactérias são os glicopeptídeos, dentre os quais a vancomicina é, certamente, a mais conhecida, em virtude do surgimento de microrganismos a ela resistentes, como *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE) e *S. aureus* com resistência intermediária (VISA) e resistentes à vancomicina (VRSA) (CDC, 2019b).

Diferentes classes de antibióticos bacteriostáticos atuam na síntese proteica, diferindo-se, entretanto, quanto ao mecanismo, bem como quanto ao espectro de ação. São exemplos dessas classes os aminoglicosídeos, os macrolídeos e as tetraciclínas (ANVISA, 2007; MURRAY *et al.*, 2016).

Historicamente, o ápice do desenvolvimento de novas classes de drogas antimicrobianas data do início dos anos 1930, com a descoberta da penicilina por Alexander Fleming, a meados da década 80. No que tange ao progresso da medicina moderna, entretanto, o contexto atual é alarmante. Por um lado, muitas das drogas antimicrobianas até então criadas tem tornando-se gradativamente pouco eficazes e, por vezes, ineficazes. Por outro, o desenvolvimento de novas classes de drogas está estagnado (MICHAEL *et al.*, 2014).

Estudos recentes convergem quanto ao grande vácuo observado na descoberta de novas classes de antimicrobianos nas últimas três décadas. Ainda que novas classes tenham sido introduzidas recentemente, sua descoberta, em si, data no mínimo de três décadas atrás (CDC, 2019b; SILVER *et al.*, 2011; VENTOLA *et al.*, 2015). Desde então, novas versões de antibacterianos já existentes têm sido registradas, apresentando espectro de ação mais abrangentes, em uma tentativa de contornar mecanismos de resistência já relatados e promover maior segurança e simplicidade no tratamento (SILVER *et al.*, 2011).

2.3 *Microrganismos prevalentes em IRAS*

Por definição, IRAS podem ser causadas por bactérias, fungos, vírus e parasitas (WHO, 2002). Bactérias, em especial, representam a maior fração dos patógenos mais prevalentes adquiridos no ambiente de assistência à saúde e, portanto, compõem a maior parte dos microrganismos sob vigilância por *programas*, organizações e centros internacionais de controle e prevenção de doenças (CDC, 2019a, b; WHO, 2018, 2014a).

A transmissão de microrganismos pode se dar por contato direto, de pessoa a pessoa, indireto, entre paciente objetos inanimados contaminados, e por via aérea, sendo o ar um veículo carreador de gotículas e aerossóis (PAO, 2008). A exposição ao

microrganismo, no entanto, não causa impreterivelmente uma infecção. A probabilidade de uma exposição levar ao desenvolvimento de uma infecção depende de um conjunto de fatores intrínsecos, como a susceptibilidade do paciente e resistência antimicrobiana pelo microrganismo em questão, e extrínsecos, como fatores ambientais. (WHO, 2009)

Estudos recentes de prevalência de IRAS em diversas regiões do mundo, incluindo a América do Sul, apontam para um padrão similar de microrganismos isolados. Em 2007, a segunda versão do estudo Prevalência Extensiva de Infecções em Cuidado Intensivo (EPIC II) contou com 75 países do leste e oeste europeu, Américas Central e do Sul, Ásia, Oceania e África, contabilizando 1265 UTIs. Do total de pacientes infectados, em 70% obteve-se isolado positivo, dentre os quais 67% eram Gram-negativos, 47% Gram-positivos e 19% fungos. (VINCENT *et al.*, 2009).

Ainda de acordo com o estudo EPIC II, as Américas Central e do Sul apresentaram maior taxa de infecção. Nessa região, os isolados Gram-negativos mais frequentes foram *Pseudomonas spp.* (26.3%), *Klebsiella spp.* (16.1%), *Escherichia coli* (14.3%) e *Acinetobacter spp.* (13.8 %). Enquanto os Gram-positivos mais frequentes foram *Staphylococcus aureus* (19.2%), *Staphylococcus epidermidis* (9.3%) e *Streptococcus pneumoniae* (3.3%) (VINCENT *et al.*, 2009).

Mais recentemente, em 2016, outro estudo sobre a prevalência das IRAS se deu em quatro países na América Latina: Brasil, Colômbia, México e Venezuela. Ao todo, aproximadamente 2.740 pacientes de 11 hospitais participaram do estudo. Dentre os países avaliados, o Brasil apresentou a menor prevalência de IRAS, com 7,23% dos pacientes apresentando pelo menos uma IRAS. Em contrapartida, a Venezuela apresentou a maior prevalência (17,97%), seguida do México (13,24%) e Colômbia (11,40%) (HUERTA-GUTIÉRREZ *et al.*, 2019).

De acordo com estudo, do total de IRAS avaliadas, 42% apresentaram isolados positivos, sendo o maior grupo de microrganismos encontrados da família *Enterobacteriaceae* (41,4%), seguido de cocos Gram-positivos (22%), bacilos Gram-negativos não-fermentadores (19,8%) e fungos (10,6%). Quanto aos microrganismos

mais frequentemente identificados, houve variação entre países (HUERTA-GUTIÉRREZ *et al.*, 2019).

No Brasil, especificamente, os tipos de microrganismos identificados com maior frequência foram da família *Enterobacteriaceae* (40,9%), representada por *Klebsiella pneumoniae* (13.6%), *E. coli* (6.8%), e *Proteus mirabilis* (6.8). Em sequência, cocos Gram-positivos (34,1%), com destaque para *S. aureus* (25%), e bacilos Gram-negativos não-fermentadores (11,4%), representados em maior parte por *Acinetobacter baumannii* (9.1%) e *Pseudomonas aeruginosa* (2.3%) (HUERTA-GUTIÉRREZ *et al.*, 2019).

Somando-se ao contexto de IRAS, microrganismos resistentes a antimicrobianos compõem um tópico desafiador de enfoque para políticas de saúde pública (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004; WHO, 2015a). Em 2014, a OMS divulgou, por meio do Relatório Global de Vigilância em Resistência Antimicrobiana, dados e informações acerca de nove combinações bactéria-antimicrobiano de resistência de maior preocupação mundial: *E. coli* - cefalosporinas de 3ª geração, *E. coli* - fluoroquinolonas, *K. pneumoniae* - cefalosporinas de 3ª geração, *K. pneumoniae* - carbapenêmicos, *S. aureus* – meticilina (MRSA), *S. pneumoniae* - penicilina, *Salmonella* não-tifóide - fluoroquinolonas, *Shigella spp.* - fluoroquinolonas e *Neisseria gonorrhoeae* - cefalosporinas de 3ª geração (WHO, 2014a).

Em 2017, a OMS salientou a importância da multirresistência a antimicrobianos, por meio de uma lista de bactérias multirresistentes para as quais o desenvolvimento de novos antibióticos é urgente. Os microrganismos em questão foram subdivididos quanto à sua prioridade, de forma tal que o grupo de prioridade crítica inclui *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Enterobacteriaceae spp.* No grupo de alta prioridade encontram-se *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonellae spp.*, alguns bacilos Gram-negativos não-fermentadores e *Neisseria gonorrhoeae*. Por fim, no grupo de médio risco, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, e *Shigella spp.* (WHO, 2017).

Dentre os diferentes microrganismos listados pela OMS, observa-se representantes do grupo de bactérias multirresistente de grande preocupação em ambiente de

assistência à saúde: ESKAPE, que reúne *E. faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* e *Enterobacter spp.* (RICE, 2008). Alguns autores, entretanto, sugerem e reconhecem a substituição do termo ESKAPE por ESCAPE, em que C se refere a *Clostridioides difficile*, em reconhecimento a alta frequência de IRAS provocadas pelo microrganismo e sua resistência antimicrobiana, e à família *Enterobacteriaceae* (AKOVA *et al.*, 2016).

Nos Estados Unidos, relatórios da Rede de Segurança Nacional de Cuidado em Saúde (NHSN, do inglês, *National Healthcare Safety Network*) apontam para o grupo ESKAPE como a causa majoritária de IRAS nos hospitais do país (NNIS, 2004; EDWARDS *et al.*, 2008). Em 2019, a NHSN divulgou uma análise de dados de 5.626 unidades de assistência à saúde nos Estados Unidos, entre 2015 e 2017. Os isolados mais comumente reportados foram *E. coli* (18%), *S. aureus* (12%) e *Klebsiella spp.* (9%). Quanto à associação entre patógeno e agente antimicrobiano mais reportada, observou-se *S. aureus* não susceptível a meticilina, *Enterococcus spp.* a vancomicina, *E. coli* a fluoroquinolonas e *P. aeruginosa* a aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e cefalosporinas de espectro estendido (ESCs) (HORAN *et al.*, 2008; HUERTA-GUTIÉRREZ *et al.*, 2019).

No Brasil, dados divulgados pelo Boletim de Saúde do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 14 (ANVISA) apontam como os principais microrganismos multirresistentes associados às IPCS, em UTIs adulto, pediátrica e neonatal: MRSA, *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE), β -lactamases de espectro estendido (ESBL) em *Enterobacteriaceae*, enterobactérias resistentes a carbapenêmicos (CRE), cepas resistentes a cefalosporinas de amplo espectro (ESC-R) e bacilos Gram-negativos não-fermentadores resistentes a carbapenêmicos, com destaque para *Acinetobacter spp.* e *P. aeruginosa* (ANVISA, 2016a).

Dessa forma, no contexto de IRAS e microrganismos multirresistentes, a relevância de representantes da família *Enterobacteriaceae* é evidente em escala global e nacional. O que somado à grande dificuldade de produção de novos antimicrobianos para o tratamento de infecções causadas por bactérias entéricas Gram-negativas justifica a atenção dada a esses microrganismos (WHO, 2014a).

2.4 Enterobactérias

A família *Enterobacteriaceae* comporta a maior e mais diversa gama de bacilos Gram-negativos de importância clínica, comumente denominados enterobactérias, ou bactérias entéricas, (MURRAY *et al.*, 2016). São microrganismos ubíquos, encontrados na água, solo, vegetação e como parte da microbiota intestinal de muitos animais, inclusive humanos, sendo morfológica e fisiologicamente similares. Trata-se de bacilos retos Gram-negativos, não esporulados, aeróbios facultativos, fermentadores de glicose e de necessidades nutricionais simples. (MURRAY *et al.*, 2016)

Algumas espécies causam uma grande variedade de doenças em humanos. Aproximadamente um quarto das bacteremias, mais de 70% das ITUs e muitas infecções intestinais são causadas por membros da família *Enterobacteriaceae*. Enquanto algumas são de hábito de vida estritamente patogênico (*Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhi e *Shigella* spp.), outras são comensais presentes na microbiota intestinal que podem ocasionar infecções oportunistas (*E. coli* e *K. pneumoniae*) (MURRAY *et al.*, 2016).

2.4.1 *Enterobacteriaceae* produtoras de β -lactamases de amplo espectro

Resistência a β -lactâmicos mediada por β -lactamases compõe o mecanismo de resistência mais antigo já reportado. Pouco após a introdução da penicilina natural por Ian Fleming, no início da década de 40, a atividade de enzimas capazes de inativá-la foi identificada. O desenvolvimento consequente de novos β -lactâmicos de maior estabilidade à hidrólise enzimática e maior espectro de ação foi, então, acompanhado pelo surgimento de novas β -lactamases (BUSH *et al.*, 2011).

Enterobactérias e outras bactérias Gram-negativas não-fermentadoras apresentam β -lactamases de origem cromossômica, no entanto, genes que codificam tais enzimas e estão presentes em elementos genéticos móveis constituem o fator de maior preocupação clínica (BUSH *et al.*, 2011; CDC, 2019a). As β -lactamases de espectro

estendido (ESBLs) são capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas e alguns monobactâmicos, acarretando a necessidade de tratamentos mais complexos com carbapenêmicos para infecções comuns (CDC, 2019a; SANTOS *et al.*, 2015).

Outra questão de grande preocupação reside no fato de muitos genes que codificam β -lactamases estarem associados ao aparecimento de resistência a múltiplas classes de antimicrobianos. E na tentativa de contornar a atividade de ESBLs, outros antimicrobianos vêm sendo extensivamente usados, por vezes combinados, resultando em opções escassas disponíveis para o tratamento de infecções por Enterobacteriaceae produtoras de ESBL (ESBL-PE) (BUSH *et al.*, 2011). Linhagens de *E. coli* produtoras de ESBLs, por exemplo, geralmente apresentam resistência a muitas outras classes de drogas antimicrobianas, tornando-as resistentes a todos β -lactâmicos disponíveis (WHO, 2018).

Dentre ESBL-PE, *Klebsiella pneumoniae* apresenta grande relevância no contexto de IRAS e microrganismos multirresistentes, como assinalado pela OMS (WHO, 2014a; WHO, 2017). *K. pneumoniae* codifica β -lactamases a partir de um gene de resistência cromossomal, limitando o tratamento de infecções severas a carbapenêmicos. As opções de tratamento tornam-se escassas, no entanto, quando linhagens de *K. pneumoniae* apresentam ainda resistência a carbapenêmicos, como se observa em KPC (WHO, 2018).

Outro grupo de bactérias Gram-negativas não-fermentadoras ESBL de grande relevância em IRAS é o CESP, composto pelos gêneros *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Providencia*, *Morganella* e *Hafnia* (SANTOS *et al.*, 2015). Bactérias pertencentes ao grupo possuem grande potencial de tornarem-se resistentes durante o tratamento com β -lactâmicos, visto que são produtoras β -lactamases cromossômicas de classe 1, referidas como AmpC, induzíveis pela presença de β -lactâmicos em diferentes intensidades (HANSON, 2003).

2.4.2 Enterobacteriaceae Resistentes a Carbapenêmicos

Enterobactérias que apresentam resistência a no mínimo um dos antibióticos carbapenêmicos ou produzam carbapenemases são categorizadas como

Enterobacteriaceae Resistentes a Carbapenêmicos (CRE, do inglês Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*). A resistência em CRE pode originar-se da combinação de mutações cromossômicas e elementos genéticos móveis de origem plasmidial. Genes que codificam carbapenemases, enzimas que tornam carbapenêmicos ineficazes, estão em grande parte localizados em elementos genéticos móveis (CDC, 2019a).

CRE subdividem-se, genericamente, entre produtoras de carbapenemases (CP-CRE, do inglês *Carbapenems-producing CRE*) e não produtoras (*non-CP-CRE*). Plasmídeos em CP-CRE frequentemente albergam outros elementos de resistência e aproximadamente 30% de CRE carregam elementos móveis que codificam enzimas. A rápida disseminação horizontal de tais genes de resistência a outras bactérias susceptíveis, associada a maior probabilidade de aparecimento de multirresistência justifica, portanto, a importância desses microrganismos dentro do contexto mundial de IRAS (LUTGRING *et al.*, 2016; CDC, 2019b).

Dentre as carbapenemases identificadas em maior frequência, a *K. pneumoniae* carbapenemase (KPC), reportada pela primeira vez em 2001 nos Estados Unidos, atualmente conta com 12 variantes isoladas de amostras clínicas em *E. coli*, *Salmonella enterica*, diferentes espécies de *Enterobacter* e outros bacilos Gram-negativo como *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia sp.* (SUAY-GARCÍA *et al.*, 2019; CDC, 2019b; BUSH *et al.*, 2011).

2.4.3 *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae é uma bactéria bacilar Gram-negativa, não-móvel, envolta por uma camada polissacarídica, conhecida como cápsula. Visualmente, a produção de cápsulas espessas confere aspecto mucoide e viscosidade às colônias redondas e convexas de *K. pneumoniae*. Metabolicamente, como anaeróbias facultativas, são capazes de fermentar glicose, e, a depender da subespécie, sacarose. Não produzem ácido sulfídrico (H₂S) e não apresentam triptofano-desaminasse e, por isso, não produzem indol. Algumas subespécies, como *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, possuem aparato enzimático para hidrolisar ureia e descarboxilar lisina, enquanto *K.*

pneumoniae subsp. *ozaenae* apresentam reações diferentes das demais subespécies (GRIMONT *et al.*, 2015).

O gênero *Klebsiella* compreende bactérias ubíquas, que podem ser encontradas colonizando superfícies mucosas de mamíferos. *K. pneumoniae* pode ser encontrada vivendo de forma comensal na nasofaringe e trato intestinal de humanos. Entretanto, como patógenos oportunistas, estão fortemente relacionadas a IRAS, causando infecções no trato respiratório superior e inferior, trato urinário e até corrente sanguínea (CDC, 2010; GRIMONT *et al.*, 2015).

Dentro de espaços voltados para a assistência à saúde, a disseminação de *K. pneumoniae* se dá mais comumente por contato direto pessoa-a-pessoa e ainda pelo ambiente, por meio de aparatos médicos, como cateter central e tubos ou cânulas para ventilação mecânica (CDC, 2010). Essa espécie também é conhecida por albergar uma grande diversidade de genes de resistência a antimicrobianos e ainda desempenhar um importante papel na disseminação de tais genes para outros patógenos de importância clínica (WYRES and HOLT *et al.*, 2018).

Em ordem cronológica de detecção, dentre os genes de resistência encontrados em *K. pneumoniae*, o gene cromossomal que codifica a β -lactamase SHV-1 foi o primeiro reportado na espécie e confere resistência intrínseca a ampicilina. Outras β -lactamases como SHV-2, TEM-3 e CMY-1 são codificadas por formas móveis desse gene cromossomal e já foram reportados em outros membros da família Enterobacteriaceae. O gene móvel mais amplamente disseminado entre enterobactérias, no entanto, é o CTX-M (WOODFORD *et al.*, 2004; WYRES and HOLT *et al.*, 2018).

Tão logo as fluoroquinolonas e carbapenêmicos foram introduzidas como opção de tratamento, genes móveis de resistência a essas classes foram reportados pela primeira vez em *K. pneumoniae*, como *qnrA* e *qnrB*, para fluoroquinolonas, e *bla_{KPC}* e *bla_{OXA}*, para carbapenêmicos. As metallo- β -lactamases, como NMD-1 também são enzimas codificadas por gene de origem plasmidial identificadas em *K. pneumoniae*. Já o primeiro gene de resistência a polimixina (ou colistina), *mcr-1*, foi reportado em *K. pneumoniae* e *E. coli* em 2015 (WYRES and HOLT *et al.*, 2018).

2.5 Terapias direcionadas ao hospedeiro

A possibilidade de controle das interações entre patógeno e hospedeiro por meio da imunomodulação representa uma área de grande interesse no combate a doenças infecciosas. Nesse sentido, terapias direcionadas ao hospedeiro (HDTs, do inglês *host-directed therapies*) tem se mostrado promissoras enquanto tratamento adjuvante, associado a antimicrobianos clássicos, a fim de modular a resposta imune do hospedeiro e contribuir para a eliminação de patógenos em infecções de difícil tratamento (REKHA *et al.*, 2020).

No tocante ao crescente problema mundial de RAM, ainda que o desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos seja de grande importância, o uso exclusivo desses agentes não tem se mostrado eficaz no combate à incidência global de RAM (STOCKS *et al.*, 2018). Nesse sentido, HDTs, cujo alvo não é o patógeno em si, se apresenta como uma promissora alternativa terapêutica, visto que abordagens baseadas em HDTs são menos propensas à resistência terapêutica, em comparação a métodos que tem como alvo direto o patógeno (KAUFMANN *et al.*, 2017). Acredita-se que o desenvolvimento de resistência às HDTs requereria do patógeno encontrar vias alternativas para sua replicação, de modo a diminuir sua dependência dos fatores do hospedeiro alvo da terapia, ou promover a evasão de mecanismos de defesa ativados pela mesma. Sendo tais mecanismos e fatores evolutivamente conservados, o desenvolvimento de resistência pelo patógeno demandaria mutações consideráveis. Soma-se a isso o fato de HDTs serem empregadas como adjuvante a tratamentos canônicos (KAUFMANN *et al.*, 2017).

Atualmente, uma gama considerável de HDTs vêm tornando-se disponíveis e outras encontram-se em desenvolvimento (MAEURER *et al.*, 2016). As HDTs utilizam de pequenas moléculas capazes de modular a resposta imune do hospedeiro, interferindo em fatores celulares necessários para a replicação e persistência do patógeno, aumentando os mecanismos efetores contra o mesmo e regulando, ainda, fatores que podem levar ao desequilíbrio da resposta, e consequentemente, exacerbação da inflamação e dano tecidual (KAUFMANN *et al.*, 2017). Assim,

conhecer os mecanismos de defesa do hospedeiro humano a infecções por microrganismos multirresistentes pode apontar novos alvos para HDTs.

Os mecanismos de defesa do hospedeiro humano frente à exposição a microrganismos potencialmente patogênicos distinguem-se quanto ao nível de especialização para enfrentar o patógeno em questão. Em linhas gerais, o mecanismo mais simples abrange barreiras físicas, seguido pelas repostas imunes inata e adaptativa. Enquanto as barreiras físicas, tal qual a pele, secreções gastrointestinais e muco, são mecanismos passivos de proteção contra patógenos, a imunidade inata e adaptativa corresponde à forma ativa de resistir à infecção e à doença (MURRAY *et al.*, 2016).

A imunidade inata, mais especificamente, conta com leucócitos capazes de reconhecer e eliminar patógenos, bem como seus produtos, promovendo assim uma resposta rápida e pouco específica contra a invasão e expansão do mesmo. Dentre os leucócitos que compõem a imunidade inata, as células fagocíticas, também denominadas fagócitos, desempenham um importante papel na contenção do patógeno e na regulação da resposta inflamatória à infecção, sendo que muitas ainda estabelecem uma conexão entre as respostas imune inata e adaptativa (MURRAY *et al.*, 2016; MADIGAN *et al.*, 2016).

Os macrófagos, em especial, abrangem uma população altamente heterogênea. Provenientes de precursores mielóides, esses fagócitos são encontrados em diferentes órgãos e tecidos, onde podem especializar-se por meio de estímulos do microambiente tecidual, assumindo diferentes funções e fenótipos. Nos ossos, por exemplo, macrófagos diferenciam-se em osteoclastos, no fígado em células de Kupffer, nos rins em células mesangiais intraglomerulares e no pulmão em macrófagos alveolares (KHAN *et al.*, 2019; MURRAY *et al.*, 2016).

Independente dos possíveis fenótipos que macrófagos assumem, seu papel primordial reside na articulação de uma resposta imune que resulte na eliminação do microrganismo invasor (STOCKS *et al.*, 2018). Para esse fim, as funções básicas dos macrófagos abrangem: a fagocitose de patógenos, de seus produtos e detritos; a apresentação de antígenos a linfócitos T, a fim de promover uma resposta adaptativa;

e secreção de diferentes tipos de citocinas, para ativação ou supressão da resposta inflamatória (KHAN *et al.*, 2019; MURRAY *et al.*, 2016).

Macrófagos podem ainda assumir diferentes estados funcionais, denominados estados de polarização. Diante de um microrganismo invasor em determinado tecido, os monócitos, células precursoras de macrófagos circulantes na corrente sanguínea, são recrutados e migram para o sítio afetado. Uma vez no sítio acometido, macrófagos podem assumir seu clássico estado de polarização (M1) pró-inflamatório, ou um estado alternativo anti-inflamatório e imunorregulador (M2) (KHAN *et al.*, 2019). A diferenciação entre os estados de polarização M1 e M2 é estimulada por produtos microbianos, bem como citocinas pró e anti-inflamatórias (WYNN *et al.*, 2013). Nos estágios iniciais de uma infecção, macrófagos recrutados frequentemente apresentam o fenótipo M1. Nesse estado pró-inflamatório, mecanismos de contenção do microrganismo invasor encontram-se ativos, por meio da alta expressão de receptores de partículas opsonizadas, como receptores de fatores do complemento, produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e alta capacidade de apresentação de antígenos, com aumento da expressão de moléculas de MHC de classe II e moléculas co-estimuladoras, como CD80 e CD86 (WYNN *et al.*, 2013; KHAN *et al.*, 2019, MURRAY *et al.*, 2016).

Ao longo do curso da infecção, entretanto, a resposta excessiva e prolongada desencadeada por M1 pode ser deletéria ao hospedeiro. Dessa forma, o processo de cronificação da infecção é acompanhado por uma alteração no perfil de resposta pró-inflamatória para anti-inflamatória, promovida pela polarização do tipo M2. Contrapondo-se ao potencial dano tecidual promovido pelo perfil M1, fenótipos M2 detém propriedades imunorreguladoras que promovem a resolução da inflamação (BENOIT *et al.*, 2008, WYNN *et al.*, 2013).

Interessantemente, a resposta promovida pelo fenótipo M1 é apontada como comum frente a infecções bacterianas agudas, visto que a indução da expressão de muitos dos genes em células nesse estado de polarização independe da espécie de bactéria envolvida. Dentre os produtos da expressão de tais genes encontram-se citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e receptores, além de enzimas que atuam na síntese de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, envolvidas na atividade bactericida de

macrófagos. Estudos associam ainda o perfil de resposta promovido por macrófagos pró-inflamatórios a infecções não controladas. Algumas bactérias patogênicas têm se demonstrado capazes de impedir a polarização do tipo M1 e promover a polarização do tipo M2, de modo a neutralizar mecanismos bactericidas (BENOIT *et al.*, 2008).

2.5.1 O metabolismo de triptofano como alvo para HDTs

No que concerne à imunomodulação, moléculas já descritas têm despertado interesse da comunidade científica devido a sua capacidade de promover ou suprimir a resposta imune, dentre essas, metabólitos do triptofano (ROOKS *et al.*, 2016). O triptofano (TRP) é um dos nove aminoácidos denominados essenciais. Sendo o corpo humano incapaz de sintetizá-los, o fornecimento desses aminoácidos provém da dieta (HUBBARD *et al.*, 2015). Fontes comuns de triptofano são alimentos ricos em proteínas, como carne, peixe, ovos, algumas frutas e castanhas, leite e derivados (ROAGER *et al.*, 2018; DEHHAGHI *et al.*, 2019). O TRP ingerido é mobilizado principalmente para a síntese proteica, podendo atuar como substrato na produção das coenzimas responsáveis pela geração de energia celular (dinucleótido de nicotinamida e adenina, NAD, e fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina, NADP) e ainda como precursor de diferentes metabólitos (DEHHAGHI *et al.*, 2019; AGUS *et al.*, 2018).

O metabolismo do TRP livre pode ocorrer por três vias: (1) pela via das quinureninas, a partir de células epiteliais intestinais e leucócitos; (2) pela microbiota intestinal; e (3) pela via de produção de serotonina, principalmente no trato gastrointestinal (Figura 1). Em condições homeostáticas, a via das quinureninas representa cerca de 92-95% do catabolismo de todo TRP livre ingerido, seguido pela microbiota (4 a 6%) e pela via da serotonina (1 e 2%) (TALEB *et al.*, 2019; DEHHAGHI *et al.*, 2019).

Dentro da via das quinureninas, a enzima indolamina-2,3-dioxigenase (IDO), principalmente a isoforma IDO1, realiza a maior parte do catabolismo de TRP, gerando uma série de metabólitos endógenos denominados conjuntamente quinureninas (ZELANTE *et al.*, 2013). Após a absorção pelas células epiteliais intestinais, o aminoácido alcança o sistema porta-hepático, para então ser

catabolizado pela enzima triptofano 2,3-dioxigenase (TDO) encontrada nos hepatócitos. Em seguida, o TRP não utilizado é excretado na corrente sanguínea e, ao atingir tecidos periféricos, catabolizado pela IDO1, expressa em células epiteliais intestinais, células dendríticas e, principalmente, em macrófagos (Figura 1) (TALEB *et al.*, DEHHAGHI *et al.*, 2019; STOCKS *et al.*, 2018).

Muitos metabólitos de TRP podem atuar na regulação das respostas imune inata e adaptativa por meio da ativação do receptor de hidrocarbonetos aromáticos (AHR) expresso em leucócitos, células epiteliais e algumas células tumorais (ROOKS *et al.*, 2016; ROAGER *et al.*, 2018; HUBBARD *et al.*, 2015). Os AHR integram ambas respostas por mecanismos que incluem a repressão da expressão de genes de fase aguda da infecção, a diferenciação de linfócitos T reguladores e linfócitos B, bem como a promoção da homeostase intestinal (HUBBARD *et al.*, 2015; ZELANTE *et al.*, 2013; ROOKS *et al.*, 2016, ZHANG *et al.*, 2016). À vista disso, não surpreendentemente, o catabolismo do TRP candidatos é um potencial candidato a alvo para desenvolvimento de HDTs (BESSEDE *et al.*, 2014; GUTIÉRREZ-VÁZQUEZ; QUINTANA, 2018).

Estudos recentes têm explorado o emprego de HDTs para induzir a sensibilização de microrganismos multirresistentes. *REKHA et al* (2020) demonstraram que a ativação de mecanismos efetores da resposta imune por meio das moléculas vitamina D3, 4-fenilbutirato (PBA) e composto de fenilenodiamina aroilada (HO53) em combinação com antibióticos é capaz de contornar a resistência em *K. pneumoniae*. Assim, nesse trabalho buscamos estudar o envolvimento do metabolismo de triptofano em macrófagos na sensibilização a carbapenêmicos de amostras de *K. pneumoniae* multirresistentes isoladas de pacientes acometidos por IRAS.

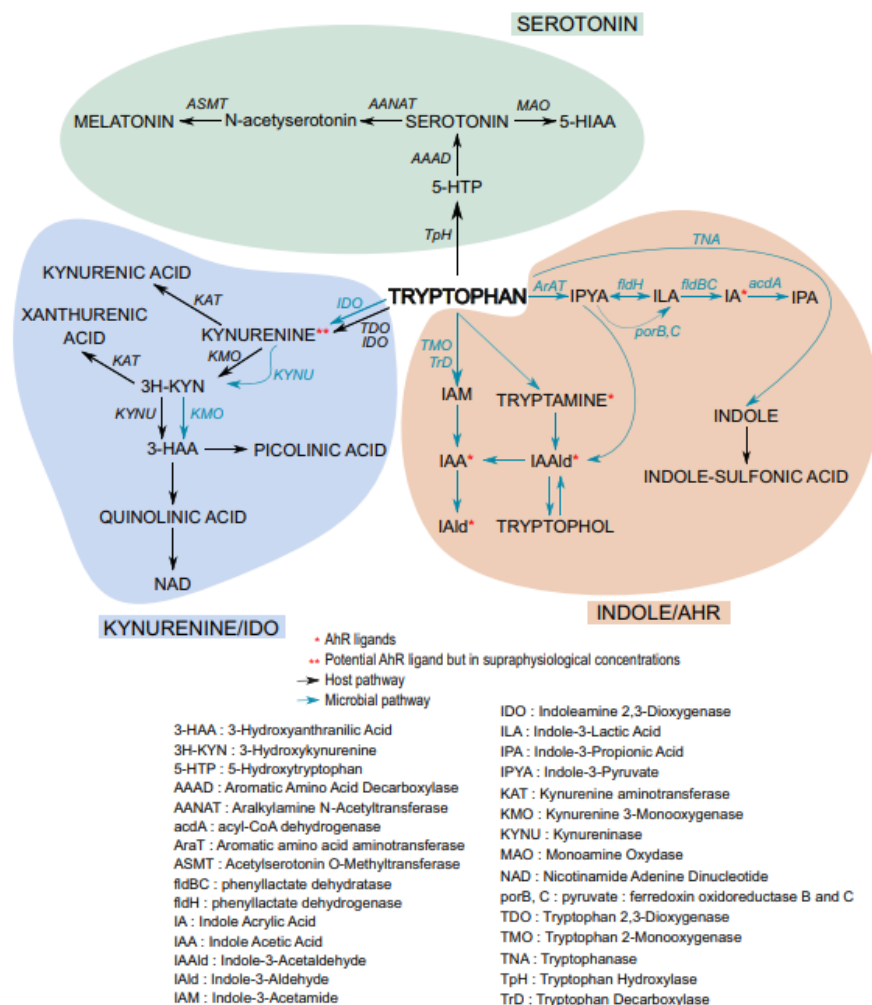


Figura 1 - Vias de metabolismo do triptofano: O triptofano pode ser metabolizado pela microbiota intestinal, em rosa, pela via das kinurerina, em azul, e pela via de produção de serotonina, em verde. Fonte: AGUS et al., 2018.

3 OBJETIVOS

3.1 *Objetivo geral*

Estudar o envolvimento do metabolismo de triptofano em macrófagos na sensibilização a carbapenêmicos de amostras de *K. pneumoniae* multirresistentes isoladas de pacientes do Hospital Risoleta Tolentino Neves acometidos por IRAS.

3.1.1 *Objetivos específicos*

- Avaliar a ocorrência, a distribuição e o perfil de resistência dos microrganismos aos antimicrobianos em IRAS, em um hospital da rede pública de BH;
- Montar um biobanco de isolados clínicos multidroga-resistentes do ano de 2019;
- Definir os isolados clínicos alvos para estudos *in vitro* e caracterizá-los fenotípica e geneticamente;
- Padronizar ensaios de fagocitose de amostras de bactérias multirresistentes por linhagens de macrófagos previamente ativadas ou não;
- Avaliar se as amostras de bactérias multirresistentes tornam-se sensíveis a imipenem quando fagocitadas por macrófagos e qual o papel de IDO1 nesse fenômeno.
- Avaliar a ressensibilização a antimicrobianos dos isolados de escolha em BMDM selvagens ativados ou não;
- Avaliar o papel da enzima IDO1 na ressensibilização dos isolados de escolha a antimicrobianos em BMDM deficientes para IDO1 ativados ou não.

4 METODOLOGIA

4.1 Aspectos Éticos

O estudo aqui apresentado foi submetido e aprovado pelo Núcleo de Ensino e Pesquisa e Extensão (NEPE) do HRTN, sob o número NEPE nº22/2018, e ao Comitê de Ética e Pesquisa (COEP) da UFMG, CAAE 52924621.1.0000.5149. Os dados dos pacientes foram mantidos em sigilo, em conformidade com a Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002). Todos os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética na utilização de animais (CEUA) sob o número de protocolo 257/2020. Os isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* MDR utilizados no estudo foram cadastradas no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), em conformidade com a Lei nº 13.123/15.

4.2 Avaliação situacional de IRAS

4.2.1 Local de Estudo

O Hospital Risoleta Tolentino Neves (HRTN) é um hospital de ensino público de grande porte responsável pela assistência a pacientes de urgência clínica e cirúrgica, traumatológica e não traumatológica, habitantes no Eixo Norte da Região Metropolitana de Belo Horizonte. Filantrópica, e sem fins lucrativos, a instituição é gerida pelo governo de Minas Gerais, Prefeitura de Belo Horizonte e Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), por meio da Fundação de Desenvolvimento e Pesquisa (FUNDEP), e conta atualmente com 340 leitos, sendo 42 do Centro de Terapia Intensiva (CTI) (HRTN, 2020).

4.2.2 Obtenção e Análise de Dados

A fim de avaliar a ocorrência e a distribuição de IRAS no HRTN, bem como a diversidade microbiana e os perfis de resistência a antimicrobianos dentro do contexto de IRAS, dados banco de dados alimentado pelo setor de microbiologia foram analisados.

Foram considerados dados de 1574 pacientes admitidos no hospital entre 1 de Janeiro e 31 de Dezembro de 2019, com tempo de internação igual ou superior a 1 dia, com idade a partir de 18 anos, de ambos os sexos, e que preencham os critérios de IRAS do Sistema Nacional de Vigilância de Infecções Nosocomiais (NNISS, do inglês *National Nosocomial Infection Surveillance System*) e do manual “Critérios Diagnósticos de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde” da ANVISA, adotado pela CCIH/HRTN (ANVISA, 2013; EDWARDS *et al.*, 2008).

As seguintes variáveis epidemiológicas foram consideradas: sexo, data de nascimento, tempo de internação do paciente; motivo da alta e setor de atendimento; data da coleta e tipo de material biológico, microrganismo isolado; perfil de sensibilidade a antimicrobianos; e antimicrobianos testados.

Para representar a distribuição de todos microrganismos agrupados a nível de gênero e/ou espécie, os setores do HRTN foram estratificados por andar e tipo de serviço prestado, sendo que os andares organizam-se da seguinte forma: O segundo andar abriga as salas de pré-parto, parto e puerpério, ginecologia em uma ala, e ortopedia em outra; o terceiro andar abriga o alojamento da maternidade e a neonatologia; o quarto andar, o setor de internação geral e pós-cirúrgico ortopédico; o quinto andar internação do serviço de cardiologia; e sexto andar internação de pacientes em cuidados paliativos.

Os isolados clínicos identificados a nível de gênero e/ou espécie foram classificados quanto ao perfil de susceptibilidade a antimicrobianos com base nos resultados dos testes de susceptibilidade a antimicrobianos *in vitro* por meio do sistema comercial automatizado VITEK 2 (bioMérieux, Inc., NC, USA). Os microrganismos multi-droga resistentes (MDROs) foram categorizados entre ESBL, KPC, MRSA, MRSE (*Staphylococcus coagulase-negativo* resistente à metilicina), RMER (Gram-negativos resistente a meropenem que não *Klebsiella*), POLI (Resistente à polimixina) e VRE (*Enterococcus* resistente à vancomicina). A categorização quanto aos perfis de resistência utiliza de antimicrobianos-chave de uso clínico e se dá da seguinte forma: ESBL – resistência a ceftriaxona e/ou cefepime (cefalosporinas de terceira e quarta geração, respectivamente); KPC – resistência ao meropenem, e/ ou imipenem, e/ou ertapenem (carbapenêmicos); MRSA e MRSE – resistência à oxacilina (β -lactâmico

de espectro estrito); RMER – resistência a meropenem; POLI – resistência à polimixina; e VRE – resistência à vancomicina.

Para determinar a associação entre a frequência de cada variável categórica dos pacientes e dos isolados clínicos com o desfecho clínico dos pacientes (alta e óbito) foi realizada análise bivariada aplicando o teste Qui-quadrado de Pearson (χ^2) e o teste Exato de Fisher com nível de significância de 5% ($p < 0.05$). Os dados de variáveis categóricas estão representados por meio de frequências absolutas (n) e porcentagem (%), associados aos respectivos valores de p.

A variável quantitativa (tempo de internação) foi avaliada quanto à sua normalidade por meio do teste de Shapiro-Wilk. Ao verificar que a variável não assume uma distribuição normal foi analisada pelo teste de Mann-Whitney com nível de significância de 5% ($p < 0.05$).

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism versão 9.0 (GraphPad Prism Software. San Diego, CA, EUA) e o Pacote Estatístico para Ciências Sociais SPSS (Statistical Package for Social Sciences) versão 26 (IBM®. Armonk, New York, USA).

4.3 Montagem do Biobanco de Isolados Clínicos e Amostragem

O laboratório de microbiologia do HRTN forneceu 113 isolados classificados como MDR. Primeiramente, a fim de se atestar sua viabilidade, todos isolados foram cultivados em 10 mL de caldo LB (Biolog, Inc.,EUA) *overnight* a 37°C sob agitação. Inicialmente, 10 µL da amostra em caldo foram plaqueados por esgotamento do inóculo em ágar não seletivo e incubado *overnight* a 37°C e a morfologia das colônias observada. Aquelas cuja morfologia se destoava do esperado para o microrganismo identificado foram ainda submetidas a coradas por Gram (Laborclin) e observadas em microscópio óptico.

Dentre os 113 isolados fornecidos, 73 estavam viáveis e apresentavam morfologia das colônias e/ou das bactérias coradas por Gram condizente com a identificação previamente informada. Para a construção de um biobanco de amostras, aquelas viáveis tiveram uma colônia isolada cultivada em 10 mL de caldo LB (Biolog, Inc.,EUA)

overnight a 37°C sob agitação. Após centrifugação a 3000 rpm por 10 min (Megafuge 16R da Thermo Scientific™), o precipitado de cada amostra foi ressuspendido em caldo Tioglicolato (AcuMedia®) a 20% de Glicerol P.A. e alíquotas foram acondicionadas em microtubos para criopreservação a -80 °C.

4.4 Caracterização Fenotípica dos Isolados Clínicos alvo e linhagens de referência de *Klebsiella pneumoniae*

Os isolados selecionados e duas linhagens de referência laboratorial de *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603™ e ATCC 13883™) foram submetidos a uma série de testes bioquímicos para confirmação da identificação informada pelo laboratório e para fins de controle e normatização. As amostras foram plaqueadas em ágar MacConkey (Microgen) por esgotamento de inóculo e incubadas por até 16h a 37°C. Com o auxílio de uma agulha bacteriológica descartável, uma colônia de cada isolado foi inoculada em meio Rugai-modificado (Renylab), de acordo com as instruções do fabricante. A leitura e interpretação dos resultados se deu em até 24 h pós-incubação a 37 °C.

Os isolados e as linhagens de referência também foram testados quanto à sua susceptibilidade a ampicilina, imipenem, ciprofloxacino, gentamicina e estreptomicina. Os testes foram realizados pelo método de microdiluição em caldo em placas de 96 poços de fundo em “u”, a partir de um inóculo de 5×10^5 UFC por poço, em 100 µL de caldo Mueller Hinton (HiMedia Laboratories) em diferentes concentrações dos antimicrobianos, segundo orientações do manual *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically* publicado pelo *Clinical Laboratory Standards Institute®* (CLSI, 2022a). A Concentração Inibitória Mínima (MIC), expressa em µg/mL, foi utilizada para definir as concentrações dos antimicrobianos de escolha nos ensaios subsequentes. A classificação das amostras como resistente ou sensível foi baseada nos *breakpoints* estipulados pelo manual publicado pelo CLSI *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, que estipula resistência para ampicilina MIC ≥ 32 µg/mL, para ciprofloxacino MIC ≥ 1 µg/mL, para imipenem MIC ≥ 4 µg/mL, e para gentamicina MIC ≥ 16 µg/mL. Quanto à

estreptomicina, o CLSI não estipula *breakpoints* para microdiluição em caldo para a ordem Enterobacterales. (CLSI, 2022b).

4.5 Caracterização Genética dos Isolados Clínicos alvo e linhagens de referência de *K. pneumoniae*

Para caracterização genotípica dos isolados clínicos, bem como das linhagens de referência mencionada no tópico anterior, foi empregada a técnica de ERIC-PCR (do inglês, *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-Polymerase Chain Reaction*).

4.5.1 Extração do DNA Bacteriano

Para extração do DNA bacteriano, o kit de extração e purificação QIAamp® DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Germany) foi utilizado seguindo as especificações do fabricante que podem ser resumidas aos seguintes passos: (1) os isolados e as linhagens de referência foram crescidos em 10 mL de caldo LB (Biolog) *overnight* a 37°C. A cultura foi centrifugada a 3000 rpm por 10 min, o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspensionado em 1 mL de água para injeção; (2) 200 µL da suspensão foi transferida para um microtubo contendo 15 µL de proteinase K e sobre a suspensão adicionou-se 200 µL do *Buffer* AL; (3) a solução foi homogeneizada em agitador de tubos por 15 s e em seguida incubada a 70°C em banho-seco por 10 min; (4) após incubação, 200 µL de etanol PA foi adicionado ao microtubo que foi homogeneizado brevemente em agitador de tubos; (5) o conteúdo final foi transferido para a coluna de purificação acoplada a um microtubo coletor, ambos fornecidos pelo fabricante; (6) o sistema coluna-microtubo coletor foi centrifugado a 2.100 xg por 1 min; (7) o microtubo coletor foi descartado e outro foi acoplado à coluna; (8) adicionou-se 500 µL do *Buffer* AW2 à coluna e o sistema foi centrifugado a 2.100 xg por 3 min; (9) o passo 7 foi repetido e 200 µL do *Buffer* AE adicionado à coluna para eluição do DNA e o sistema foi centrifugado uma última vez a 2.100 xg por 1 min.

4.5.2 Amplificação de Sequências Consenso-Intergênicas Repetitivas de Enterobactérias (ERIC) e construção de dendogramas

A amplificação das sequências ERIC do DNA extraído dos isolados e das linhagens de referência foi feita no termociclador Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific). Para isso o par de iniciadores universais para enterobactérias foi utilizado (VANDER ZEE et al. 2003): Iniciador 1 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3' e Iniciador 2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3').

Os produtos da extração do DNA bacteriano obtidos no item anterior foram quantificados utilizando-se o espectrofotômetro NanoDrop™ 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific, USA). A quantidade de DNA utilizada para a reação de amplificação foi de 50 ng. Para o preparo do mix de trabalho, o kit GoTaq® G2 Hot Start Taq Polymerase (Promega Corp., USA) foi utilizado, sendo a proporção de reagentes para uma reação foi de 0,2 µL de Taq polimerase, 0,5µL de dNTPs a 10 µM, 2 µL de *Buffer*, 2 µL de MgCl₂ e 1,5 µL de cada iniciador a 10 pM. O volume final por reação foi de 20 µL, sendo 10 µL de DNA e 10 µL de mix de trabalho.

As condições adotadas para a PCR foram as seguintes: 3 min a 94°C para desnaturação inicial; 40 ciclos de 94°C por 30 s, 52°C por 1 min e 72°C por 2 min; e 6 min a 72°C para extensão final.

Para eletroforese em gel de agarose, 10 µL de cada produto de amplificação foi adicionado a 1 µL de BlueJuice™ Gel Loading Buffer (10X) (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific) e aplicado a um gel de agarose a 2% em tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1X. Para determinação do tamanho dos produtos amplificados, um padrão molecular de DNA Ladder de 100 bp (Thermo Fisher Scientific) também foi aplicado ao gel, que foi então submetido a eletroforese a 60mV por 2 h.

Decorrido o tempo de corrida, o gel foi imerso em uma solução de revelação contendo GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain 10,000X (Biotium, USA) e TAE 1X na proporção 1:10.000 e mantido sob agitação por 20 min.

Imagens do gel foram, por fim, obtidas utilizando o sistema de detecção ChemiDoc XRS e o software Image Lab 6.0.1 (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) e então

processadas pelo o software GelJ, Java 8 (Oracle Corp., USA). Um dendrograma foi construído usando os coeficientes de correlação de Pearson com agrupamento pelo método do grupo de par não ponderado com médias aritméticas (UPGMA).

4.5.3 Amplificação de genes de resistência *blaKPC*

Os isolados clínicos e as linhagens de referência foram testados para a presença do gene de resistência *blaKPC*, utilizando-se como iniciador 1 (5'-ATGTCACTGTATCGCCGTCT-3') e iniciador 2 (5'-TTACTGCCCGTTGACGCCC-3'), cujo produto tem tamanho de 882 bp.

Após a extração, os produtos do DNA bacteriano obtidos foram quantificados por espectrofotômetro NanoDrop™ 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific, USA) e a quantidade de DNA por reação de amplificação foi de 50 ng. O kit GoTaq® G2 Hot Start Taq Polymerase (Promega Corp., USA) foi utilizado para o preparo do mix de trabalho, sendo a proporção de reagentes para uma reação de 0,2 µL de Taq polimerase, 0,5µL de dNTPs a 10 µM, 2 µL de *Buffer*, 2 µL de MgCl₂ e 1,5 µL de cada iniciador a 20 pM. O volume final por reação foi de 20 µL, sendo 10 µL de DNA e 10 µL de mix de trabalho.

As condições adotadas para a PCR foram as seguintes: 3 min a 94°C para desnaturação inicial; 30 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 1 min e 72°C por 1 min; e 5 min a 72°C para extensão final.

Para eletroforese em gel de agarose, 10 µL de cada produto de amplificação foi adicionado a 1 µL de BlueJuice™ Gel Loading Buffer (10X) (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific) e aplicado a um gel de agarose a 1,2% em tampão TAE 1X. Para determinação do tamanho dos produtos amplificados, um padrão molecular de DNA Ladder de 100 bp (Thermo Fisher Scientific) também foi aplicado ao gel, que foi então submetido a eletroforese a 80mV por 50 min.

Decorrido o tempo de corrida, o gel foi imerso em uma solução de revelação contendo GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain 10,000X (Biotium, USA) e TAE 1X na proporção 1:10.000 e mantido sob agitação por 20 min. Para visualização do produto amplificado,

imagens do gel foram obtidas utilizando o sistema de detecção ChemiDoc XRS e o software Image Lab 6.0.1 (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA).

4.6 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 selvagens (WT), machos de 8 semanas de idade, obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e camundongos deficientes para a enzima Indolamina-2,3-dioxigenase (IDO1^{-/-}), fêmeas de 8 semanas de idade, obtidos do biotério do Laboratório de Imunofarmacologia, do Departamento de Bioquímica e Imunologia, do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG. Os animais tiveram acesso a água e ração sem restrição e foram mantidos sob controle de temperatura (28 a 30°C), umidade (50%), ventilação e ciclo da luz (claro-escuro).

4.7 Macrófagos: Origem e Obtenção

Para os ensaios de determinação dos índices de fagocitose e *killing* e ressensibilização a imipenem foram utilizados macrófagos derivados da linhagem monocítica humana THP-1 (M-THP-1, TIB-202™) e/ou derivados da medula óssea (BMDM) de camundongos C57BL/6 WT e IDO1^{-/-}.

Para obtenção de M-THP1, as células THP-1 foram transferidas para placas de 24 poços de fundo chato na concentração de 5×10^5 células por poço em 500 µL de RPMI 1640 (Cultilab) suplementado com 20% v/v de soro fetal bovino (SFB, Sigma-Aldrich®) e PMA (Merck, Sigma-Aldrich®) a 5 ng/mL. As placas foram incubadas em estufa a 5% de CO₂ atmosférico e 37°C por 24 horas e então utilizadas para ensaios subsequentes.

Enquanto para obtenção de BMDM, células da medula de camundongos selvagens (WT) e deficientes para a enzima (IDO1) (IDO1^{-/-}) foram extraídas dos fêmures e tíbias dos animais cultivadas em placas de Petri contendo DMEM (Cultilab) suplementado com 20% v/v de SFB e sobrenadante de cultura de células de fibrosarcoma de camundongo, L929, a 30% v/v (DMEM 20/30). L929 conhecidamente

secreta M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) que promoverá a diferenciação das células da medula em macrófagos murinos.

As placas de Petri foram incubadas em estufa a 5% de CO₂ atmosférico e 37°C por 24 horas e, a cada dois dias, acrescidas de 5 mL de DMEM 20/30. Decorridos 7 dias da extração, as células haviam aderido à superfície plástica da placa de Petri e com o auxílio de um raspador de células descartável foram removidas e transferidas para placas de 24 poços de fundo chato a uma concentração de 5×10^5 células por poço em 500 µL de DMEM suplementado com SFB a 10% v/v e sobrenadante de cultura, L929, a 5% v/v (DMEM 10/5). As células foram utilizadas para ensaios subsequentes 24 horas após o plaqueamento.

4.8 Ativação de macrófagos

As células M-THP-1 e BMDM (WT e IDO1^{-/-}) plaqueadas segundo o item anterior foram lavadas com PBS 1X, a fim de retirar células não aderidas e, em seguida, adicionadas de DMEM ou RPMI 1640 suplementados com SFB a 5%v.v contendo IFN-γ murino (Cat. 315-05-100UG, Pepro Tech, Inc., Thermo Fisher Scientific) a 10 U/mL e LPS (Merk, Sigma-Aldrich) a 10 ng/mL. As placas foram incubadas em estufa a 5% de CO₂ atmosférico e 37°C por 48 horas.

4.9 Avaliação da viabilidade celular

As células THP-1 e BMDM ativadas foram testadas quanto à sua viabilidade por ensaio colorimétrico com MTT, no qual se quantificou a formação cristais de MTT-formazan, e pela determinação da atividade da enzima desidrogenase láctica no sobrenadante (LDH). Paralelamente, células da mesma linhagem, não ativadas foram mantidas por 48 horas somente com meio suplementado com soro a 5%v/v. sob as mesmas condições e submetidas aos mesmos ensaios.

Para a determinação da LDH, utilizou-se o kit Desidrogenase Láctica LDH UV (Bioclin - Quibasa). O sobrenadante das células foi coletado e 4 µL transferidos para placas de 96 poços de fundo reto e adicionados de 100 µL da solução de trabalho preparada

segundo instruções do fabricante. A leitura da absorbância foi feita 1, 2 e 3 minutos após a adição da solução de trabalho a 340 nm em leitor de ELISA (Biotek, EUA). Os resultados foram obtidos calculando-se a média das três leituras multiplicada pelo fator de correção e expressos em U/L.

Após a retirada do sobrenadante, as células foram lavadas com PBS 1X e incubadas com 300 µL de PBS 1X contendo o reagente MTT (Invitrogen™, USA) a 5 mg/mL em estufa a 5% de CO₂ atmosférico e 37°C por 3 horas. O sobrenadante foi então retirado e 300 µL de DMSO P.A adicionado aos poços e a leitura da absorbância foi realizada a 570 nm em leitor de ELISA.

4.10 Avaliação da produção de ROS e expressão de marcadores de superfície por citometria de fluxo de células ativadas ou não

Para marcação de ROS, após o descarte do sobrenadante, as células BMDM (WT e IDO1-/-) e M-TPH-1 plaqueadas, ativadas ou não foram lavadas com PBS 1X, acrescidas de seus respectivos meios de cultura contendo SFB a 1%v/v e CellROX™ Deep Red Reagent (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific) a 5 µM e incubadas em estufa a 5% de CO₂ atmosférico e 37°C por 30 min.

As células BMDM (WT e IDO1-/-) foram então lavadas com PBS 1X, coletadas com auxílio de um raspador de células descartável e transferidas para um microtubo contendo PBS 1X a 0,5% p/v de BSA. Após centrifugação por 7 min a 4 °C e 1700 rpm, o sobrenadante foi descartado e aos tubos adicionou-se 20 µL de um mix dos seguintes anticorpos conjugados a fluorocromos: anti-mouse CD45 (clone 3Q-F11, diluição 1:100), anti-mouse CD11b (clone M1/70, diluição: 1:50), F4/80 (clone BM8, diluição 1:50), anti-mouse CD80 (clone 16-10A1, diluição 1:50), anti-mouse CD86 (clone GL1, diluição 1:100) e anti-mouse MHC-II (clone M5/114.15.2, diluição 1:200).

Os microtubos foram incubadas ao abrigo da luz a 4°C por 20 minutos e as células lavadas uma última vez com PBS 1X a 0,5% p/v de BSA, centrifugadas por 7 min a 4 °C e 1700 rpm e ressuspensas em 100 µL de PBS 1X. As amostras foram analisadas no citômetro FACSCanto™ (BD Biosciences) e no software FlowJo V10 (Tree Star Inc.).

4.11 Preparo do Inóculo

Após a caracterização fenotípica e genotípica dos isolados clínicos e linhagens de referência, os isolados 100 e 34 e *K. pneumoniae* ATCC 13883™ foram escolhidos para os ensaios subsequentes com macrófagos *in vitro*. Para o preparo do inóculo, portanto, as amostras foram previamente cultivadas em 10 mL de caldo LB (Biolog, Inc., EUA) a 37°C *overnight* em aerobiose e agitação a 120 rpm e, em seguida, centrifugadas a 3000 rpm por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em solução salina. Diluições seriadas em placas de 96 poços foram realizadas e a absorbância medida a 600 nm em leitor de ELISA.

A diluição correspondente à densidade ótica (OD) de 0,1 foi então plaqueada em ágar não seletivo, para determinação da equivalência em UFC/mL. A OD de 0,1, portanto, equivale às seguintes concentrações: $1,5 \times 10^9$ UFC/mL para *K. pneumoniae* ATCC 13883™; $1,5 \times 10^8$ UFC/mL para o isolado 34; e $2,0 \times 10^8$ UFC/mL para o isolado 100.

4.12 Determinação da porcentagem de macrófagos com bactérias fagocitadas

A fim de determinar a porcentagem de células BMDM e THP-1 com bactérias fagocitadas, lamínulas foram adicionadas aos poços da placa de 24 poços aos quais 5×10^5 das células BMDM (WT) ou M-THP-1 foram plaqueadas, em um volume de 500 µL de DMEM 10/5 ou RPMI a 5%v/v de SFB, respectivamente. As células foram pré-ativadas (item 4.2) e, paralelamente, células não ativadas das mesmas linhagens foram mantidas com seus respectivos meios de cultura a 5%v/v de SFB sob as mesmas condições.

As células foram então desafiadas com a linhagem de referência de *K. pneumoniae* ATCC 13883™ a um MOI de 5 ou 10, por 15 ou 30 min. Para a preparação do inóculo no MOI estipulado, considerou-se a OD de 0,1 e a concentração em UFC/mL equivalente para a linhagem em questão (segundo item 4.11). Em seguida, adicionou-se gentamicina a 100 µg/mL aos poços, para remoção de bactérias não fagocitadas. Os poços foram lavados com PBS 1X e as células fixadas às lamínulas com acetona P.A refrigerada a 4°C. Por fim, as lamínulas foram coradas com kit panótico rápido (Laborclin) e visualizadas ao microscópio óptico (Figura 2).

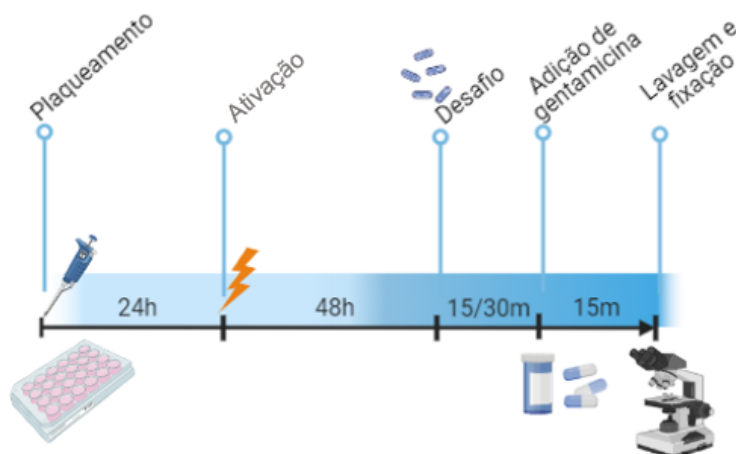


Figura 2: Representação esquemática do fluxo de trabalho do ensaio para determinação da porcentagem de macrófagos (ativados ou não) com bactérias fagocitadas.

4.13 Determinação da taxa fagocitose e recuperação de *K. pneumoniae* fagocitadas por macrófagos ativados ou não

As células BMDM (WT e IDO1^{-/-}) plaqueadas em placas de 24 poços, ativadas ou não foram desafiadas por 1h com a linhagem de referência de *K. pneumoniae* ATCC 13883TM e dois isolados clínicos (34 e 100) a um MOI de 10. Decorrido o tempo do desafio, para remoção de bactérias não fagocitadas, adicionou-se gentamicina a 300 µg/mL aos poços contendo a linhagem de referência e o isolado 100, e estreptomicina a 4 µg/mL aos poços com o isolado 34. As placas foram incubadas por 15 min e após esse período, as células foram lavadas com PBS 1X e lisadas pela adição de 200 µL de Triton X-100 a 0,1% v/v em PBS 1X e raspagem do poço com auxílio de ponteiros de 1000 µL. Diluições seriadas do lisado foram então semeadas em ágar MacConkey (Microgen) e incubadas a 37°C por 24h em aerobiose.

A taxa de recuperação das bactérias fagocitadas foi avaliada 2 horas após a adição da gentamicina e/ou estreptomicina, quando as células foram lavadas, lisadas e diluições seriadas do lisado semeadas em ágar MacConkey. A taxa de fagocitose e de recuperação de bactérias fagocitadas após 2h foi determinada pela contagem de UFC e expressa em UFC/MI (Figura 3).

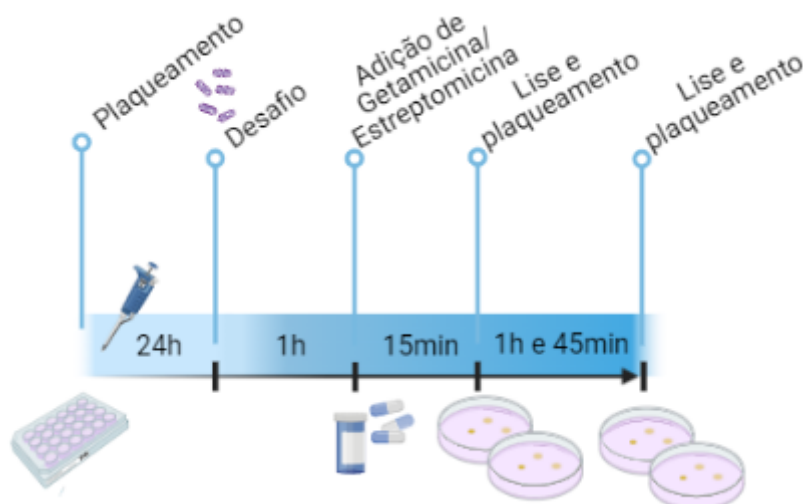


Figura 3: Representação esquemática do fluxo de trabalho do ensaio para determinação da taxa fagocitose e recuperação de *K. pneumoniae* fagocitadas por macrófagos ativados ou não

4.14 Determinação das taxas de interferência na susceptibilidade de linhagens de isolados clínicos MDR de *K. pneumoniae* a imipenem em macrófagos

As células BMDM (WT e IDO1-/-) plaqueadas em placas de 24 poços foram desafiadas por 1h com a linhagem *K. pneumoniae* ATCC 13883™ e os isolados clínicos 34 e 100 a um MOI de 10. Decorrido o tempo do desafio, para remoção de bactérias não fagocitadas, adicionou-se gentamicina a 300 µg/mL aos poços contendo a linhagem de referência e o isolado 100, e estreptomicina a 4 µg/mL aos poços com o isolado 34. As placas foram incubadas por 15 min e após esse período, as células foram lavadas com PBS 1X e adicionadas de imipenem a 32 µg/mL em meio DMEM suplementado com SFB a 1% v/v. Após 2 h de incubação com o antimicrobiano, as células foram lisadas pela adição de Triton X-100 a 0,1% v/v em PBS 1X e raspagem do poço com auxílio de ponteiros de 1000 µL. Diluições seriadas do lisado foram então semeadas em ágar MacConkey (Microgen) e incubadas a 37°C por 24h em aerobiose. A taxa de interferência na susceptibilidade a imipenem foi determinada pela contagem de UFC e expressa em UFC/mL (Figura 4). Além disso, foi também expresso em porcentagem de variação em relação ao tempo de fagocitose, ao se usar a média de UFC de macrófagos desafiados com o inóculo bacteriano por 1 hora, expostas a

gentamicina por 15 minutos e então lisadas pela adição de Triton X-100 a 0,1% v/v em PBS 1X.

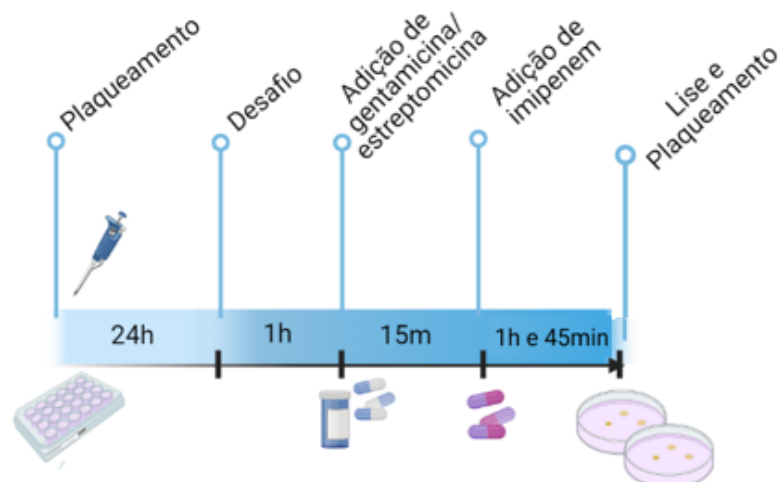


Figura 4: Representação esquemática do fluxo de trabalho do ensaio para determinação das taxas de interferência na susceptibilidade de linhagens de interferência e isolados clínicos MDR de *K. pneumoniae* a imipenem em macrófagos (ativados ou não).

4.15 Análise estatística

Para verificar se as amostras apresentam distribuição Gaussiana, foi realizado teste de normalidade. As comparações estatísticas entre os vários grupos foram feitas por ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Tukey. Para comparação entre dois grupos, quando necessário, foi utilizado o teste “t de student”. Os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão médio. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. Para a realização de todas as análises, foi utilizado o software GraphPad PRISM 9, GraphPad software Inc. (San Diego, CA, USA).

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação situacional de IRAS

5.1.1 Caracterização da população de estudo

Inicialmente, buscamos caracterizar a população acometida por IRAS incluída no estudo, comparando os diferentes estratos quanto ao desfecho clínico. Foram incluídos 1574 pacientes acometidos por IRAS, sendo que 1135 (72,1%) receberam

alta ao final da internação, ao passo que os outros 439 vieram a óbito (27,9%), como demonstrado na tabela 1. Tanto a distribuição de frequência entre os setores avaliados, quanto entre os sexos foram semelhantes, sendo 43,2% dos pacientes internados no CTI e 56,8% em outros setores do hospital, 56,5% do sexo masculino e 43,5% feminino (Tabela 1). O desfecho clínico foi estatisticamente diferente entre os estratos definidos, seja quanto ao gênero, ao setor hospitalar de internação e ao tempo de internação. A frequência de óbitos no CTI (16,4%) foi superior à do hospital (11,5%) e essa diferença se torna mais evidente ao considerar a frequência de óbitos em relação ao número total de pacientes do CTI (54,5%) e ao total dos outros setores do hospital (16,4%). A frequência de óbitos foi maior entre pacientes do sexo masculino (17,4%) em comparação ao feminino (10,5%). Ainda que o tenha havido grande variação dentro de uma mesma categoria avaliada quanto ao tempo de internação, o tempo médio de internação daqueles pacientes que vieram a óbito (49.2 ± 53.4) foi significativamente maior que o tempo de internação dos pacientes que receberam alta em comparação à alta (41.0 ± 47.2) e da população total de casos (43.3 ± 49.1). Assim, no ano de 2019, houve maior taxa de óbito associado a IRAS entre os homens e entre os pacientes internados no CTI, sendo que os pacientes que vieram a óbito apresentaram um tempo médio de internação maior que os demais pacientes acometidos por IRAS.

Tabela 1 - Caracterização da população de estudo no hospital e CTI N (%)

	Total (n=1574)	Alta (n=1135)	Óbito (n=439)	p
Sexo				
Masculino	889 (56.5)	615 (39.1)	274 (17.4)	.003 ^a
Feminino	685 (43.5)	520 (33.0)	165 (10.5)	
Setor hospitalar				
CTI	475 (43.2)	216 (13.7)	259 (16.4)	.000 ^a
Hospital	1099 (56.8)	919 (58.4)	180 (11.5)	
Tempo de internação (dias)	43.3 ± 49.1	41.0 ± 47.2	49.2 ± 53.4	.000 ^b

^aTeste Qui-quadrado (X^2) de Pearson. ^bTeste de Mann-Whitney. Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes. Valores expressos em valor absoluto e porcentual em relação ao total (n=1574).

5.1.2 Distribuição de microrganismos isolados por setor do HRTN

Os microrganismos mais frequentes entre os casos de IRAS no hospital como um todo, no ano de 2019, são *Escherichia coli* (20,1%), *Klebsiella pneumoniae* (15,7%), *Pseudomonas aeruginosa* (11,8%) *Acinetobacter baumannii* (11,4%) e *Staphylococcus aureus* (9%), compreendendo, em conjunto, mais de dois terços do universo de microrganismos isolados. De modo geral, os diferentes setores do hospital, incluindo o CTI, apresentam perfis de distribuição de microrganismos semelhantes entre si, com poucas variações de frequência, com exceção do segundo andar e da maternidade (figura 5).

Escherichia coli é uma espécie que circula entre todos setores do hospital, e está presente em maior frequência no segundo andar (81,3%) e pronto-socorro (52,2%). Sabendo-se, entretanto, que o segundo andar abriga as salas de pré-parto, parto e puerpério, e ginecologia, criou-se o setor “maternidades”, que agrupa isolados de todos andares diretamente relacionados à assistência à mulher grávida e puérpera. Assim, é possível constatar que *E. coli* corresponde a 100% dos isolados nesse setor, e isso parece impactar também na maior frequência de *E. coli* no segundo andar, justificando o fato do perfil de distribuição desse andar se destoar do hospital como um todo. Dentre os demais bacilos Gram-negativos fermentadores, *Klebsiella pneumoniae* está presente em todos os setores, exceto nas maternidades, e apresenta frequências similares ao hospital como um todo.

Quanto aos bacilos Gram-negativos não-fermentadores, *P. aeruginosa* e *A. baumannii* estão presentes em todos os setores, exceto o segundo andar e maternidades para *P. aeruginosa*, e segundo andar, maternidades e emergência para *A. baumannii*. Dentre os cocos Gram-positivos, observa-se que *S. aureus* está presente em todos setores, exceto maternidades e segundo andar, e é mais frequente no centro cirúrgico (28,9%).

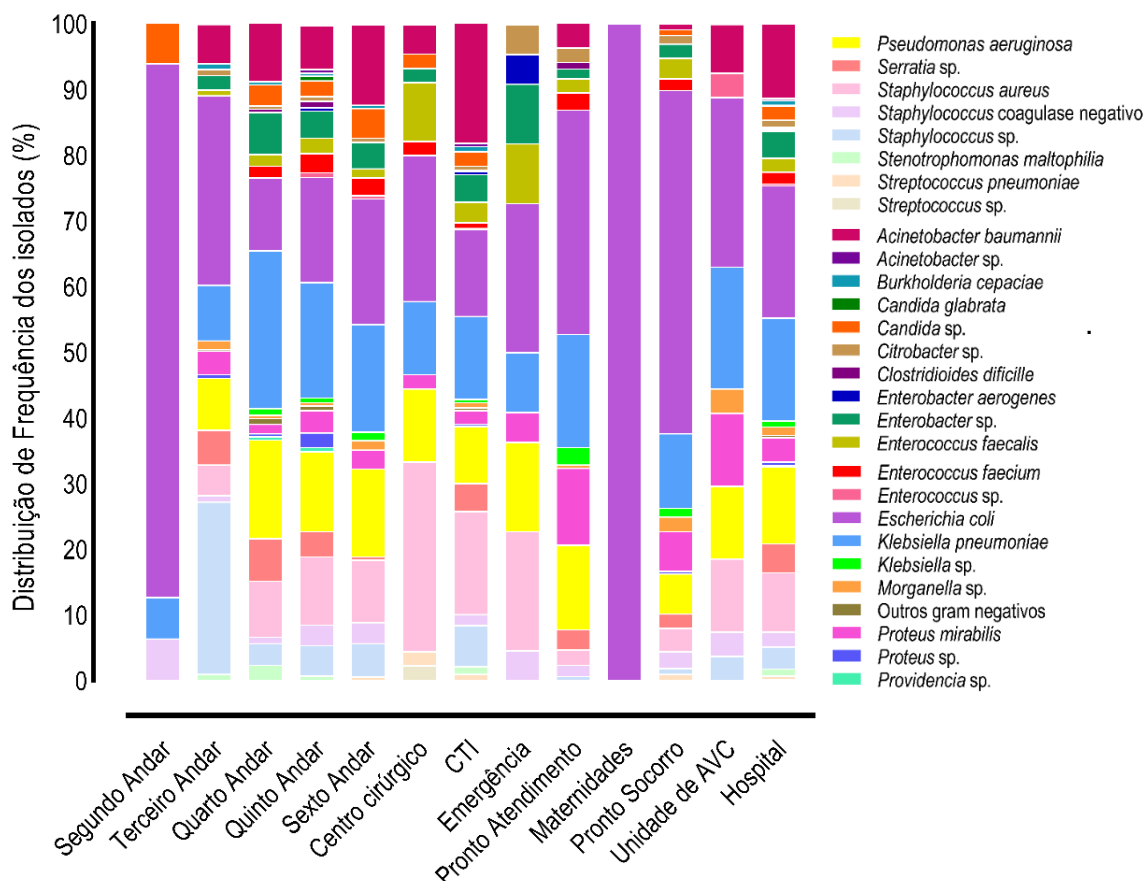


Figura 5: Diversidade microbiana dos isolados clínicos no HRTN por setores e andares.

5.1.3 Caracterização da população de estudo quanto ao gênero dos microrganismos isolados e desfecho clínico

Quanto aos números brutos (tabela 2), *Acinetobacter* apresenta o maior número total de óbitos (93), seguido de *Staphylococcus* (75), *Klebsiella* (73), *Pseudomonas* (54) e *Escherichia* (36), sendo também esses gêneros os mais frequentes no hospital (figura 6), responsáveis por mais de 75% dos pacientes acometidos por IRAS que vieram a óbito. Ao se atentar para as frequências relativa de óbitos, contudo, o gênero *Streptococcus* apresenta a maior taxa (70%), seguido de *Stenotrophomonas* (56,3%), *Acinetobacter* (50,5%), *Serratia* (37,1%) e *Candida* (34,3%). Ao avaliar a população total do hospital quanto à associação entre microrganismos isolados e desfecho clínico (tabela 2 e figura 6), constatou-se que os gêneros *Streptococcus*, *Stenotrophomonas* e *Acinetobacter*, apresentam uma frequência relativa de óbitos maior que a do hospital como um todo, ao passo que *Citrobacter* (5,9%), *Escherichia*

(11,4%) e *Proteus* (14,7%) apresentam uma frequência relativa menor que o universo total avaliado.

Tabela 2. Associação entre o gênero dos isolados e o desfecho clínico dos pacientes N (%)

	Total (n=1574)	Alta (n=1135)	Óbito (n=439)	p^a
Total	1576	1135 (72.1)	439 (27.9)	-
<i>Acinetobacter</i>	184	91 (49.5)	93 (50.5)	.000
<i>Burkholderia cepaciae</i>	11	8 (72.7)	3 (27.3)	.999
<i>Candida</i>	35	23 (65.7)	12 (34.3)	.405
<i>Citrobacter</i>	17	16 (94.1)	1 (5.9)	.044
<i>Clostridioides</i>	5	5 (100.0)	0 (0.0)	.331
<i>Enterobacter</i>	70	52 (74.3)	18 (28.7)	.398
<i>Enterococcus</i>	65	48 (73.8)	17 (26.2)	.759
<i>Escherichia</i>	317	281 (88.6)	36 (11.4)	.000
<i>Klebsiella</i>	262	189 (72.1)	73 (27.9)	.992
<i>Morganella</i>	20	16 (80.0)	4 (20.0)	.616
Outros Gram negativos	5	4 (80.0)	1 (20.0)	.999
<i>Proteus</i>	68	58 (85.3)	10 (14.7)	.017
<i>Providencia</i>	2	2 (100.0)	0 (0.0)	.999
<i>Pseudomonas</i>	186	132 (71.0)	54 (29.0)	.743
<i>Serratia</i>	70	44 (62.9)	26 (37.1)	.093
<i>Staphylococcus</i>	231	156 (67.5)	75 (32.5)	.150
<i>Stenotrophomonas</i>	16	7 (43.7)	9 (56.3)	.012
<i>Streptococcus</i>	10	3 (30.0)	7 (70.0)	.007

^aQui-quadrado (X²) de Pearson e teste Exato de Fisher. Valores de p<0.05 foram considerados estatisticamente significantes. Valores em destaque indicam significância estatística.

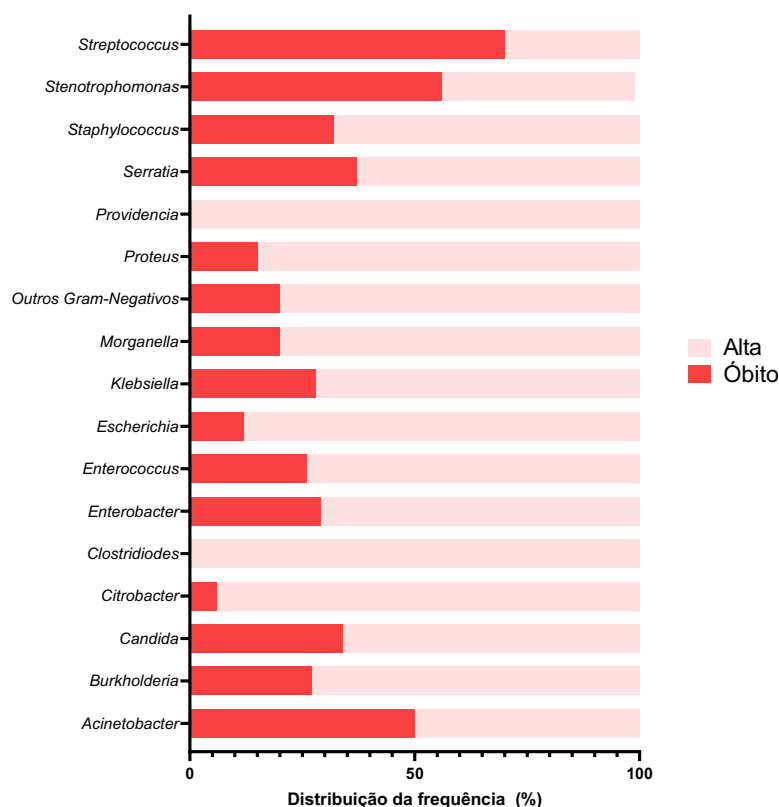
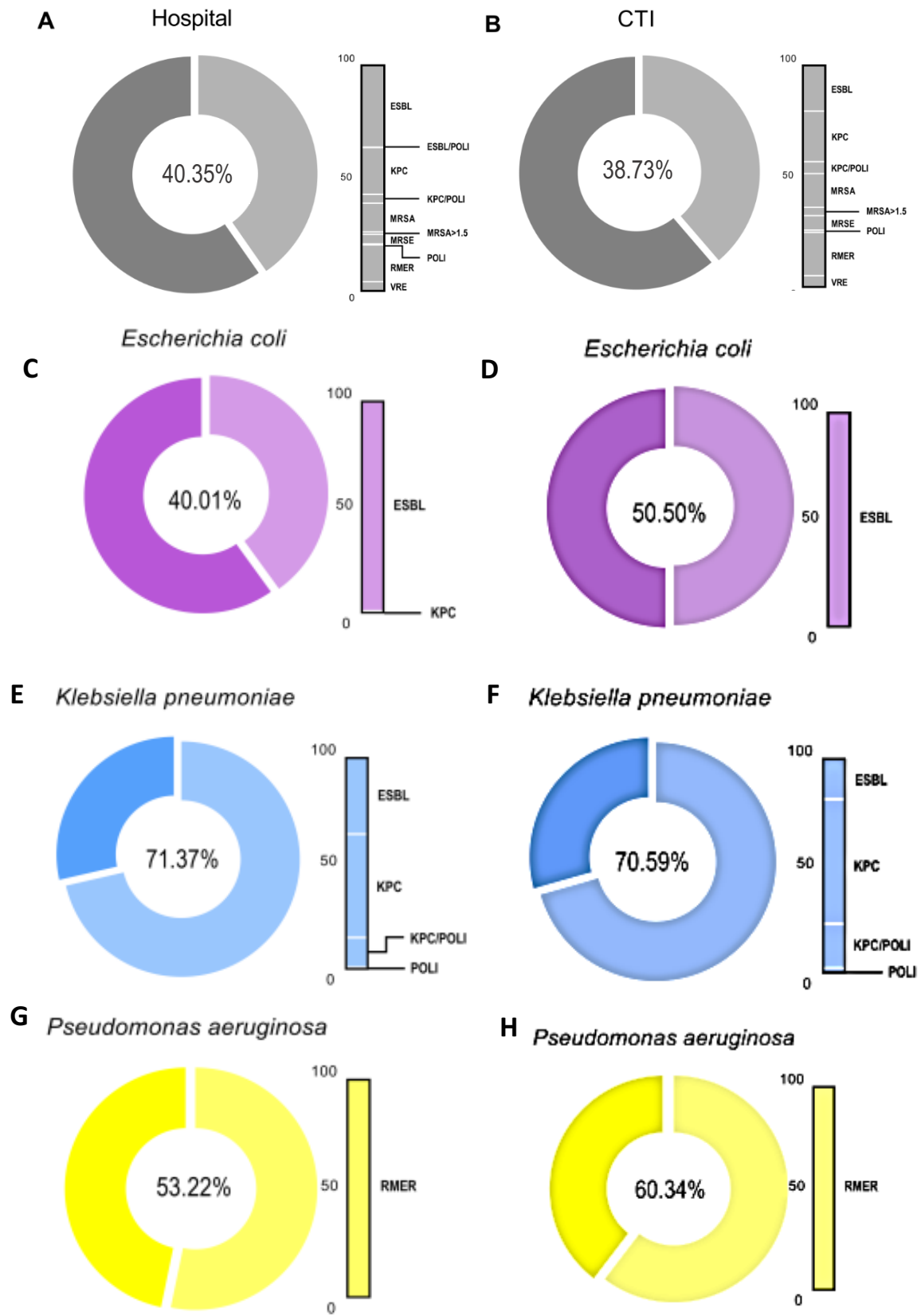


Figura 6: Associação entre o gênero dos isolados e desfecho clínico dos pacientes expresso em percentual.

5.1.4 Distribuição dos perfis de resistência entre microrganismos multidroga-resistentes (MDROs) isolados em todo o HRTN e no CTI

Como ilustrado pela Figura 7, a frequência de multidroga-resistência foi semelhante no hospital e no CTI (40,35% e 38,75%, respectivamente). Os MDROs de maior frequência em ambos espaços foram, em ordem decrescente: *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli*, totalizando 76,1% dos MDROs isolados no hospital como um todo e 74,2% dos MDROs isolados no CTI. Quanto aos perfis de resistência, ESBL e KPC foram os mais frequentes no hospital (36,3% e 20,8%, respectivamente) e no CTI (20,7% e 22,8%, respectivamente). KPC foi o perfil de resistência mais frequente em *K. pneumoniae* no hospital (49,2%) e no CTI (58,3%). ESBL foi o perfil mais frequente em *E. coli* no hospital (99,2%) e no CTI (100%). No hospital e no CTI, 100% de *S. aureus* MDR foi MRSA e 100% de *P. aeruginosa*, RMER.



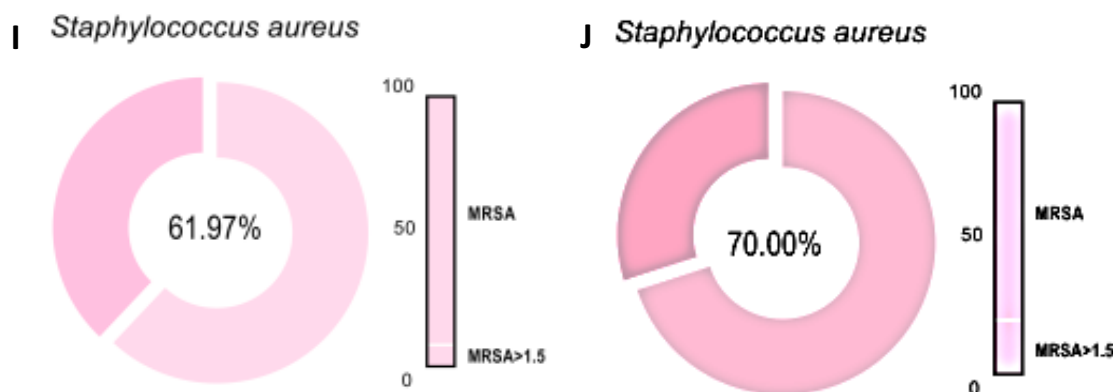


Figura 7: Frequência de MDROs e perfis de resistência de isolados de pacientes no Hospital (A) e no CTI (B). E perfis de resistência dos quatro MDROs mais frequentes no hospital (C, E, G e I) e CTI (D, F, H e J).

5.1.5 Caracterização da população de estudo quanto ao perfil de resistência dos isolados e desfecho clínico

A resistência às cefalosporinas de terceira e quarta geração (ceftriaxona e cefepeme, respectivamente) e a carbapenêmicos (ertapenem, imipenem e meropenem) apresentou significativo impacto no número de óbitos tanto no hospital como um todo (Tabela 3), quanto no CTI (Tabela 4). Considerando que resistência às cefalosporinas é o critério para classificação de microrganismos como ESBL, e aos carbapenêmicos como KPC, e RMER, é possível concluir que os perfis de resistência que impactam significativamente no número de óbitos no hospital e no CTI são justamente KPC, ESBL e RMER.

5.2 Montagem do biobanco de isolados clínicos multidroga-resistentes e seleção dos isolados alvo para estudos *in vitro*

Após a avaliação situacional de IRAS, dentre os 73 isolados viáveis, aqueles identificados como *Klebsiella pneumoniae* MDR resistentes a carbapenêmicos (KPC) provenientes de pacientes internados no CTI foram selecionados. Em casos de múltiplas amostras de um mesmo paciente, os seguintes critérios foram adotados: para amostras de mesmo perfil de resistência, foi selecionada aquela referente à primeira coleta; para perfis de resistência diferentes, todas amostras foram incluídas.

O total de isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* MDR (SisGen AF3B29C) de escolha para os ensaios subsequentes foram 10.

Tabela 3. Associação entre o perfil de resistência a antimicrobianos-chave e desfecho clínico dos pacientes do hospital N (%)

	Total (n=1574)	Alta (n=1135)	Óbito (n=439)	p ^a
Oxacilina				
Resistente	159	108 (46.6)	51 (22.0)	.462
Sensível	73	46 (19.8)	27 (11.6)	
Polimixina				
Resistente	33	24 (5.0)	9 (1.9)	.148
Sensível	445	267 (55.9)	178 (37.2)	
Cefepeme				
Resistente	686	466 (39.4)	220 (18.6)	.000
Sensível	497	405 (34.2)	92 (7.8)	
Ceftriaxona				
Resistente	613	419 (42.7)	194 (19.8)	.000
Sensível	369	309 (31.5)	60 (6.1)	
Ertapenem				
Resistente	174	116 (14.4)	58 (7.2)	.000
Sensível	632	529 (65.6)	103 (12.8)	
Imipenem				
Resistente	386	224 (37.5)	162 (27.1)	.012
Sensível	212	146 (24.4)	66 (11.0)	
Meropenem				
Resistente	425	254 (21.4)	171 (14.4)	.000
Sensível	761	623 (52.5)	138 (11.6)	

^aTeste Qui-quadrado (X²) de Pearson e teste Exato de Fisher. Valores de p<0.05 foram considerados estatisticamente significantes. Valores em destaque indicam significância estatística.

Tabela 4. Associação entre o perfil de resistência a antimicrobianos-chave e o desfecho clínico dos pacientes do CTI. N (%)

	Total (n=475)	Alta (n=130)	Óbito (n=147)	p ^a
Oxacilina				
Resistente	58	25 (31.3)	33 (41.3)	.850
Sensível	22	10 (12.5)	12 (15.0)	
Polimixina				
Resistente	13	7 (3.2)	6 (2.7)	.321
Sensível	208	83 (37.6)	125 (56.6)	
Cefepeme				
Resistente	230	95 (27.8)	135 (39.5)	.032
Sensível	112	60 (17.5)	52 (15.2)	
Ceftriaxona				
Resistente	205	84 (30.4)	121 (43.8)	.067
Sensível	71	38 (13.8)	33 (12.0)	
Ertapenem				
Resistente	58	20 (11.4)	38 (21.6)	.014
Sensível	118	64 (36.4)	54 (30.7)	
Imipenem				
Resistente	171	66 (25.7)	105 (40.9)	.055
Sensível	86	44 (17.1)	42 (16.3)	
Meropenem				
Resistente	182	70 (20.3)	112 (32.6)	.007
Sensível	162	86 (25.0)	76 (22.1)	

^aTeste Qui-quadrado (X²) de Pearson e teste Exato de Fisher. Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes. Valores em destaque indicam significância estatística.

5.3 Caracterização dos isolados clínicos de escolha e linhagens de referência

5.3.1 Descrição dos isolados clínicos segundo o laboratório de microbiologia

As informações acerca de cada paciente e os respectivos isolados clínicos encontram-se sumarizadas na Tabela 5. Os materiais biológicos foram oriundos de diferentes topografias como ponta de cateter central, aspirado bronco-alveolar, sangue, urina e outros materiais, sendo que dentro de “outros materiais” incluímos isolados cuja informação de material biológico não foi especificada no banco de dados. Dentre todas amostras, somente a 34 e 37 foram provenientes do mesmo paciente, e diferem entre si quanto ao perfil de resistência, sendo a amostra 37 resistente a polimixina além de carbapenêmicos. O desfecho clínico predominante foi óbito (8 dentre os 10 pacientes),

e quanto ao sexo, 7 dentre os 10 pacientes são do sexo masculino. A idade dos pacientes variou entre 48 e 72 anos, sendo a idade média de $58,7 \pm 9,4$ anos e o tempo de internação variou entre 31 e 94 dias, com média de $61,1 \pm 26,6$ dias.

Tabela 5 – Descrição dos Isolados Clínicos de escolha

AMOSTRA	Isolado Clínico			Paciente			
	MATERIAL BIOLÓGICO	DATA DA COLETA (Dia/Mês/Ano)	PERFIL DE RESISTÊNCIA	DESFECHEO CLÍNICO	SEXO DO PACIENTE	IDADE (anos)	TEMPO DE INTERNAÇÃO (dias)
11	Ponta de cateter central	18/06/2019	KPC	Óbito	Masculino	61	65
13	Aspirado Bronco-alveolar	13/04/2019	KPC	Alta hospitalar	Masculino	72	90
14	Sangue	11/05/2019	KPC	Óbito	Feminino	50	31
34	Ponta de cateter central	19/05/2019	KPC	Óbito	Feminino	66	35
37	Outros materiais	22/05/2019	KPC/POLI	Óbito	Feminino	66	35
44	Ponta de cateter central	31/05/2019	KPC	Alta hospitalar	Masculino	70	92
92	Aspirado Bronco-alveolar	03/02/2019	KPC	Óbito	Masculino	48	84
99	Sangue	10/06/2019	KPC	Óbito	Masculino	52	94
100	Urina	12/06/2019	KPC	Óbito	Masculino	54	45
108	Sangue	03/02/2019	KPC/POLI	Óbito	Masculino	48	40

5.3.2 Caracterização fenotípica dos isolados clínicos e linhagens de referência por testes bioquímicos

As amostras apresentaram perfil bioquímico semelhante entre si para todos os parâmetros, com exceção dos isolados 100 e 108 (Tabela 6). Em se tratando de enterobactérias, todas amostras foram capazes de fermentar glicose, visível pela produção de gás e alteração da cor azul do indicador de pH azul de bromotimol para amarelo, pela acidificação do meio. As amostras mostraram não possuir aparato enzimático para redução do tiossulfato de sódio presente no meio e, portanto, não produziram gás sulfídrico (H_2S). Em todas amostras, exceto nos isolados 100 e 108, foi detectável a presença da enzima urease, pela liberação de amônia e alcalinização do meio. Os isolados 100 e 108 também foram os únicos capazes de fermentar sacarose. Como ambos os isolados apresentavam colônias de maior tamanho e ambos os meios Rugai inoculados assumiram uma cor amarelada em toda sua extensão acredita-se que o tamanho do inóculo foi maior que o apropriado, e a

fermentação da sacarose pode ter acidificado o meio de tal forma que a alcalinização pela hidrólise da ureia foi camuflada.

As amostras apresentaram ainda atividade variável da enzima lisina descarboxilase, de modo que o meio assumiu uma cor acastanhada, entre roxo e amarelo, o que pode ser observado em *Klebsiella sp.*, segundo o fabricante. Esse estrato do meio Rugai apresenta glicose e lisina em sua composição, de modo que a atividade da enzima é atestada quando o meio antes ácido pela fermentação de glicose, se torna alcalino pela síntese de cadaverina catabolizada pela lisina descarboxilase. O meio, assim, altera sua cor de amarelo (pH ácido) para roxa (pH alcalino) com indicador Púrpura de Bromocresol.

As amostras não metabolizaram o L-triptofano presente no meio, o que levaria à produção de indol volátil revelado na cor vermelha na tampa do tubo inoculado, tampouco apresentaram motilidade.

Tabela 6 - Caracterização fenotípica das amostras por testes bioquímicos

AMOSTRA	FERMENTAÇÃO DE GLICOSE	PRODUÇÃO DE GÁS	PRODUÇÃO DE H ₂ S	HIDRÓLISE DE URÉIA	FERMENTAÇÃO DE SACAROSE	DESCARBOX. DE LISINA	DESAMIN. DE L-TRIPTOFANO	MOTILIDADE
ATCC 13883	+	+	-	+	-	+/-	-	-
ATCC 700603	+	+	-	+	-	+/-	-	-
11	+	+	-	+	-	+/-	-	-
13	+	+	-	+	-	+/-	-	-
14	+	+	-	+	-	+/-	-	-
34	+	+	-	+	-	+/-	-	-
37	+	+	-	+	-	+/-	-	-
44	+	+	-	+	-	+/-	-	-
46	+	+	-	+	-	+/-	-	-
92	+	+	-	+	-	+/-	-	-
99	+	+	-	-	+	+/-	-	-
100	+	+	-	-	+	+/-	-	-
108	+	+	-	+	-	+/-	-	-

Resultados positivos (+), negativos (-), e variáveis (+/-).

5.3.3 Caracterização fenotípica dos isolados clínicos e linhagens de referência por testes de susceptibilidade a antimicrobianos

Todos os 10 isolados e as linhagens de referência foram resistentes a ampicilina, com MIC igual ou superior a 128 µg/mL (Tabela 7). Os isolados também foram resistentes

a ciprofloxacino, com valores de MIC variando entre a 8 até superiores a 128 µg/mL, enquanto ambas as linhagens de referência foram sensíveis. Quanto ao imipenem, isolados e as linhagens de referência foram resistentes, sendo grande parte dos isolados com MIC igual ou superior a 128 µg/mL.

De todas amostras testadas, somente *K. pneumoniae* ATCC 13883 e ATCC 700603 não foram resistentes à gentamicina. E finalmente, para estreptomicina, grande parte dos isolados clínicos apresentaram MIC igual a 4 µg/mL, enquanto as linhagens de referência e os demais isolados apresentaram valores de MIC variando entre 64 µg/mL e superiores a 512 µg/mL. Assim, todos os isolados e as linhagens ATCC 13883 e ATCC 700603 podem ser considerados multirresistentes, sendo que todas as amostras, com exceção da ATCC 700603, são resistentes a carbapenêmicos.

Tabela 7 - Caracterização fenotípica das amostras por teste de susceptibilidade a antimicrobianos

AMOSTRA	AMPICILINA	CIPROFLOXACINO	IMIPENEM	GENTAMICINA	ESTREPTOMICINA
ATCC 700603	≥128	1	4	8	512
ATCC 13883	≥128	1	32	2	512
11	≥128	≥128	≥128	500	4
13	≥128	≥128	≥128	500	4
14	≥128	≥128	≥128	500	4
34	≥128	≥128	≥128	500	4
37	≥128	8	64	500	4
44	≥128	64	≥128	500	4
92	≥128	64	8	62,5	64
99	≥128	32	≥128	150	256
100	≥128	32	≥128	250	≥512
108	≥128	≥128	≥128	500	≥512

Valores de expressos em µg/mL.

5.3.4 Caracterização genética dos isolados clínicos e linhagens de referência

No tocante à amplificação de genes de resistência *bla_{KPC}*, todos isolados clínicos apresentaram em seu produto uma banda evidente e de intensidade similar entre 900 e 800 bp, demonstrando a presença do gene *bla_{KPC}* (882 bp) no isolados, mas não nas linhagens de referência (Figura 8).

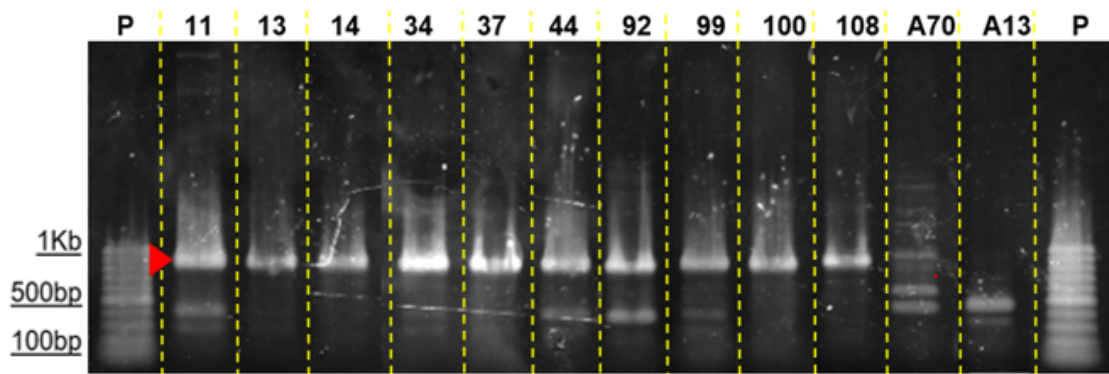


Figura 8: Produtos da amplificação do gene de resistência *bla*_{KPC} dos isolados clínicos de *K. pneumoniae* e linhagens de referência ATCC 700603 (A70) e ATCC 13883 (A13), e padrão molecular de 100 bp (P). A banda referente ao gene *bla*_{KPC} está indicado em vermelho.

Para caracterizar geneticamente os isolados, foi utilizado o método de ERIC-PCR. Conforme ilustrado pela Figura 9, os produtos de amplificação obtidos para os isolados clínicos e linhagens de referência apresentaram tamanhos variáveis entre 100 bp até comprimentos superiores a 1 kb. A intensidade das bandas apresentou grande variação entre as amostras, sendo as mais evidentes de aproximadamente 700bp presente nos isolados 37 e 99, 500 bp no isolados 37, e 400 bp na linhagem ATCC 13883 (A13). Todas as amostras apresentavam duas bandas evidentes entre 100 bp e 200 bp de intensidade similar.

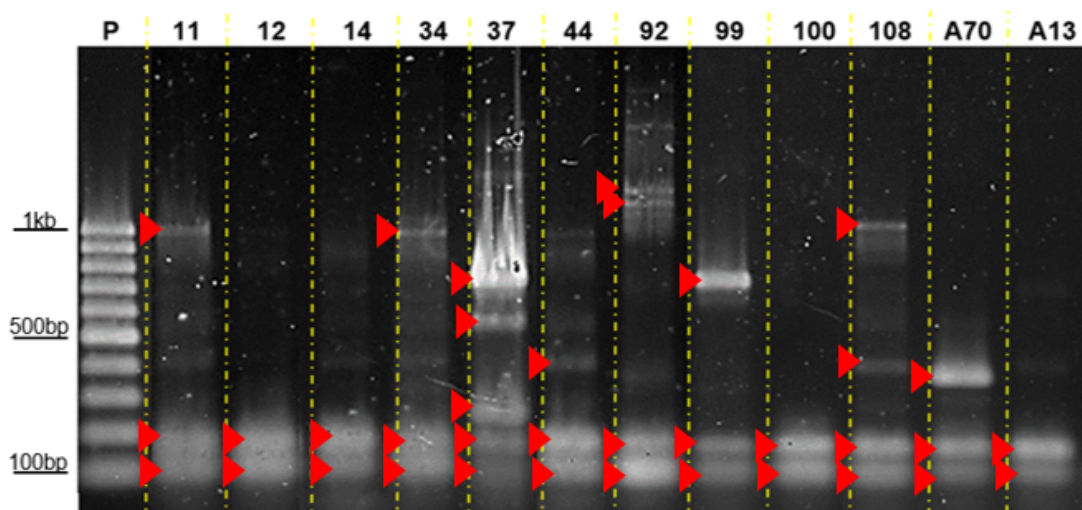


Figura 9 – Produtos da amplificação dos isolados clínicos de *K. pneumoniae* e linhagens de referência ATCC 700603 (A70) e ATCC 13883 (A13), por ERIC-PCR e padrão molecular de 100bp (P). Todas as bandas analisadas estão indicadas em vermelho.

A diversidade genética dos isolados, em comparação às linhagens de referência, foi evidenciada em uma árvore filogenética (Figura 10), na qual todas amostras possuíram um mínimo de 58% de identidade. A maior identidade observada foi de 92%, entre o isolado 100 e a linhagem ATCC 700603, e os isolados 14 e 11 (88%). O *threshold* ou raiz da árvore filogenética, demarcada em vermelho, se deu de forma arbitrária, com base na mediana das identidades das amostras (72,5%). A identidade mínima para o agrupamento em um cluster foi de 14,5%, a diferença entre a mediana das identidades e a menor identidade. As amostras foram agrupadas em 7 clusters: ATCC 13883 e 70060 e isolado 100 – A; Isolado 92 – B; 13 – C; 108 e 99 – D; 37 – E; 44 e 34 – F; e 14 e 11 – G.

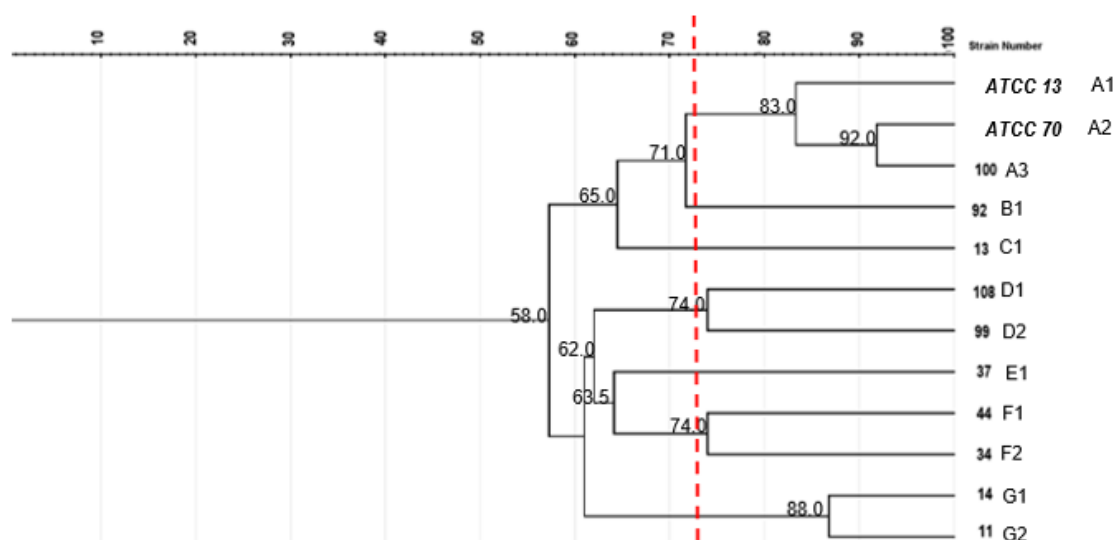


Figura 10: Filogenia dos isolados clínicos e linhagens referência de *K. pneumoniae* ATCC 13883 (A13) a partir da técnica de ERIC-PCR.

5.4 Padronização dos ensaios de infecção com isolados clínicos de escolha e linhagem de referência de *K. pneumoniae* em BMDM (WT) e M-THP-1 ativados ou não

5.4.1 Escolha do inóculo de *K. pneumoniae* e tempo de fagocitose para os ensaios subsequentes:

Inicialmente, para escolha dos inóculos de bactéria e do tempo de exposição dos macrófagos ao inóculo, BMDMs e M-THP-1 foram desafiados com MOIs de 5 ou 10

da linhagem de *K. pneumoniae* ATCC 13883 por 15 ou 30 minutos e então a percentagem de células fagocitando bactérias foi avaliada. Como demonstrado na figura 11A, BMDMs apresentam maior percentagem de células contendo bactérias quando expostas a um MOI de 10 por 30 minutos. Em contrapartida, M-THP-1 apresentam maior percentual de células contendo bactérias quando expostas a um MOI de 10 por 15 minutos (figura 11B).

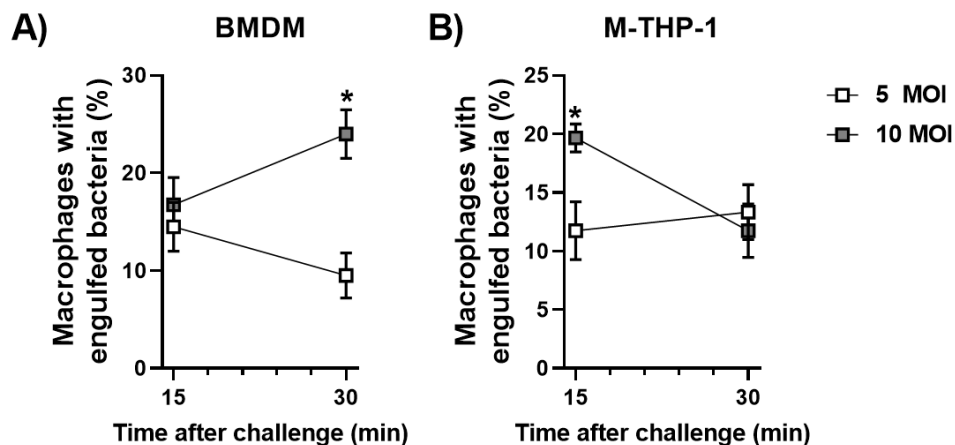


Figura 11: Avaliação da atividade fagocítica de BMDM infectados com *K. pneumoniae* ATCC 13883 a um MOI de 5 e/ou 10, com tempos de fagocitose de 15 e/ou 30 min.

5.4.2 Avaliação do protocolo de ativação com IFN γ e LPS e efeito na fagocitose e killing

A análise por citometria de fluxo das células BMDM WT e M-THP-1 marcadas com sonda para ROS evidencia que somente células BMDM ativadas apresentaram aumento da porcentagem de células marcadas (ROS⁺) (figuras 12 A e B) e intensidade média de fluorescência (MFI) de ROS significativamente maior que células não ativadas (figura 12 C e F). Sendo assim, análises mais detalhadas foram conduzidas apenas em BMDMs.

Como demonstrado na figura 13, o protocolo de ativação não interferiu na viabilidade celular, seja auferido pelo ensaio de MTT (figura 13 A) ou pelo ensaio de atividade de LDH (figura 13B), nem na expressão do receptor de fator complemento CD11b.

Porém, a exposição a IFN γ e LPS levou a aumento da expressão de MHC-II e das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86.

Embora tenha alterado o perfil de produção de ROS e de expressão de moléculas de ativação, a exposição de BMDMs a IFN γ e LPS não interferiu no percentual de células que fagocitam bactérias (figura 14 A) nem na capacidade de *killing* de bactérias por BMDMs (figuras 14 B e C).

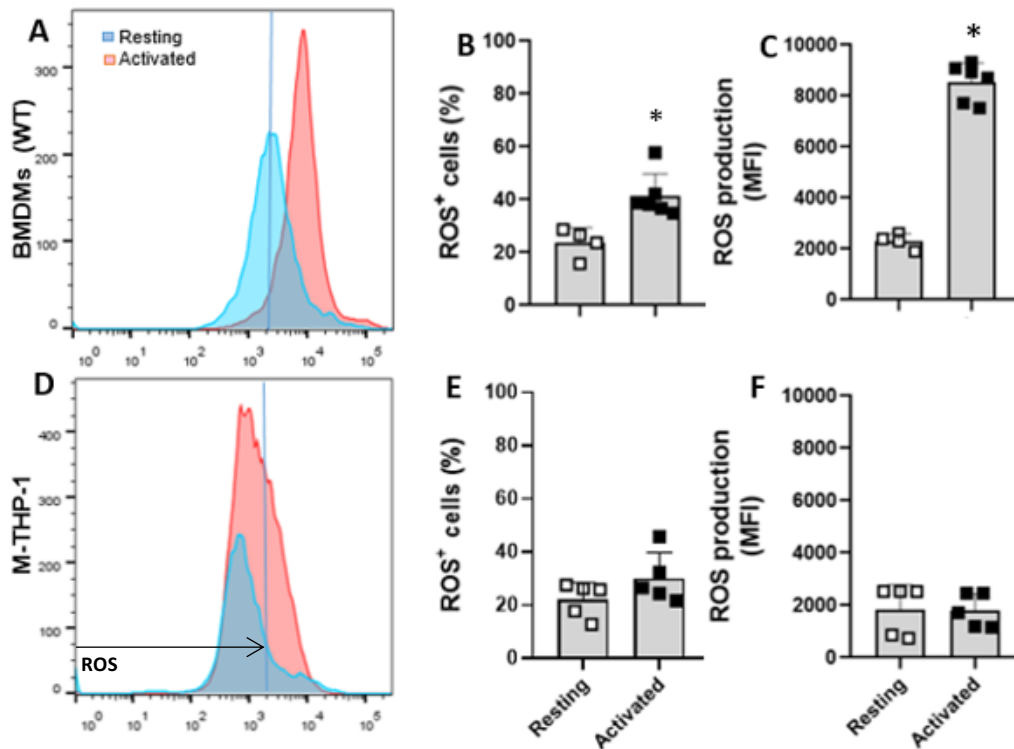


Figura 12: Avaliação da produção de ROS por células BMDM (A, B e C) e M-THP-1 (D, E e F) ativadas (activated) ou não (resting) por citometria de fluxo. A análise estatística foi realizada através do teste t de Student (B, C, E e F). Valores de * $p < 0,05$ foram estatisticamente significativos.

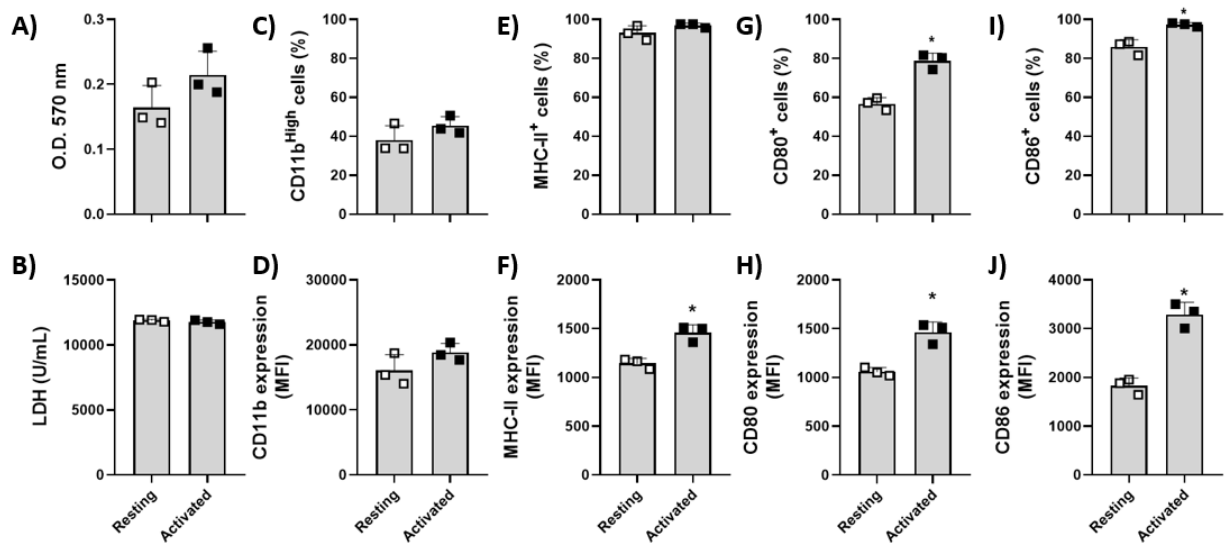


Figura 13: Avaliação da viabilidade celular (A e B) e expressão de marcadores de superfície de células ativadas ou não, apresentada em percentual de células marcadas (C, E, G e I) e MFI (D, F, H e J). A análise estatística foi realizada através do teste t de Student e valores de * $p < 0,05$ foram estatisticamente significativos.

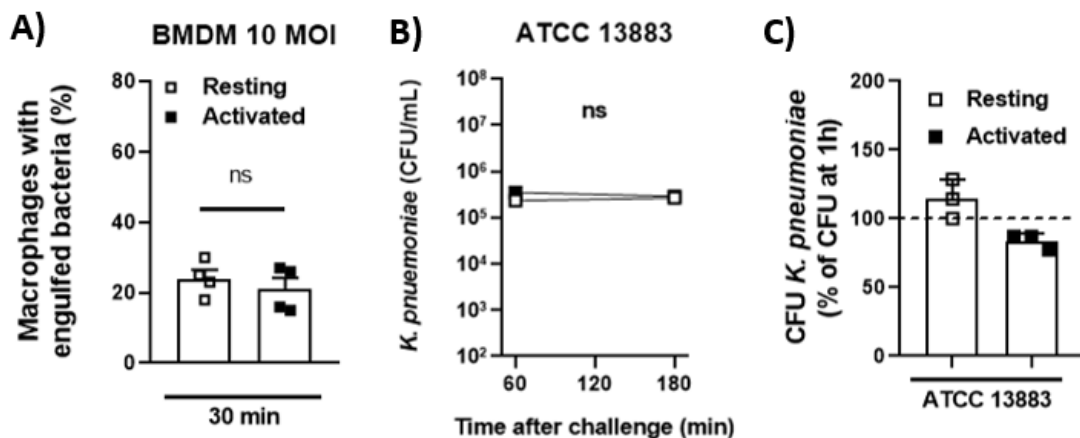


Figura 14: Avaliação da atividade fagocítica e killing de BMDM ativados e/ou não, infectados com *K. pneumoniae* ATCC 13883 a um MOI de 10, com fagocitose de 30 min, acompanhadas até 2h.

5.5 Determinação das taxas de interferência na susceptibilidade de isolados clínicos MDR de *K. pneumoniae* a imipenem em macrófagos.

Inicialmente, avaliamos o efeito da exposição a IFN γ e LPS no killing dos isolados MDR de *K. pneumoniae* Kp 34 e Kp 100 por BMDM após desafio com MOI de 10 por 30 minutos. Como demonstrado na figura 15, não houve diferenças estatísticas nos

números de CFU/mL recuperados 1 ou 2 horas após o desafio com as duas amostras entre células tratadas ou não com IFNg e LPS. Assim, os próximos experimentos utilizaram apenas células sem exposição a LPS e IFNg.

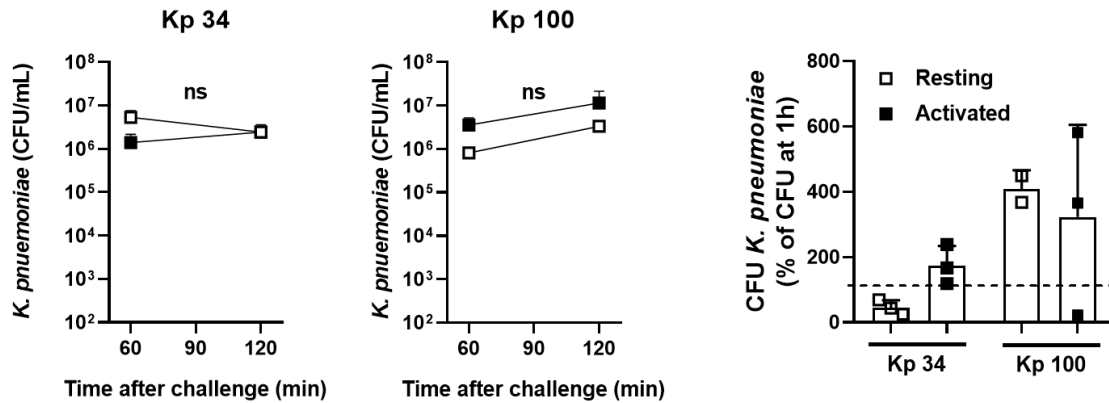


Figura 15: Avaliação da atividade fagocítica de BMDM e M-THP-1 ativados e/ou não infectados com *K. pneumoniae* ATCC 13883 a um MOI de 5 e/ou 10, com tempos de fagocitose de 30 min acompanhadas até 2h.

No experimento seguinte, foram utilizadas BMDMs obtidas de animais selvagens ou de animais IDO1^{-/-}, de modo a determinar o papel da enzima na morte intracelular de bactérias engolfadas e na sua sensibilização a imipenem. Inicialmente, foi feita uma caracterização das BMDMs IDO1^{-/-} quanto ao perfil de expressão de moléculas de superfície e produção de ROS em comparação a células WT. Como demonstrado na figura 16, BMDMs derivadas de animais IDO1^{-/-} apresentam menor expressão de CD11b e MHC-II que células selvagens, mas apresentam maior expressão de CD80 e produção de ROS. Não houve diferença para expressão de CD86 entre BMDMs dos dois genótipos.

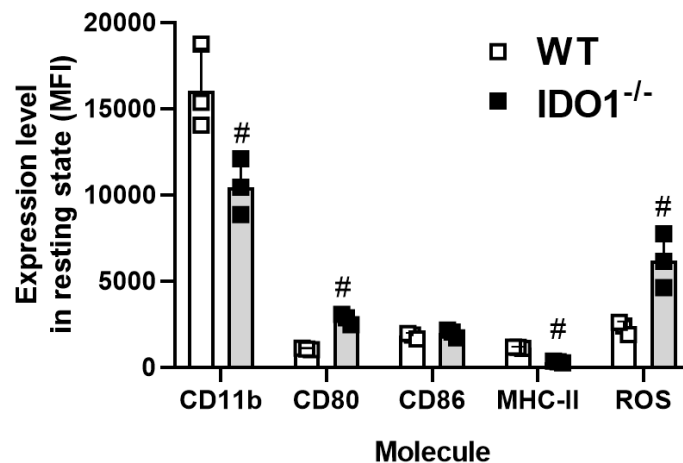


Figura 16: Avaliação da expressão de marcadores de superfície por citometria de fluxo de células BMDM WT e IDO1^{-/-} não ativadas. A análise estatística foi feita por *Multiple t-test*, valores de # $p < 0,05$ foram estatisticamente significativos.

Para avaliar o efeito da fagocitose na sensibilização a imipenem, BMDMs dos dois genótipos foram desafiadas com as amostras 34 ou 100 (MOI 10) e, após uma hora de desafio, as bactérias não internalizadas foram mortas com Gentamicina ou Estreptomicina por quinze minutos. Então, as células foram incubadas por mais 2 horas na presença ou não de imipenem (32 $\mu\text{g/mL}$). Como demonstrado na figura 17 D, foi recuperada uma menor quantidade de CFUs de células IDO1^{-/-} desafiadas com Kp 100 quando comparado com BMDMs selvagens.

Não houve diferenças estatísticas na quantidade de CFUs após duas horas de desafio (figura 17 B) ou na variação percentual de CFUs entre 2 horas e 1 hora (figura 17 C) pós desafio com Kp34 para as células selvagens ou IDO1^{-/-}. Da mesma forma, para essa amostra, a exposição a imipenem não causou qualquer efeito nesses parâmetros em BMDMs de ambos os genótipos (figuras 17 B e C).

Em contrapartida, como demonstrado nas figuras 17 E e F, células selvagens expostas a imipenem apresentaram menor recuperação de CFUs e redução percentual de CFUs entre os *time points* avaliados após desafio com Kp100 quando comparadas com BMDMs selvagens não tratadas com imipenem.

Após 2 horas, em células não tratadas com imipenem, foi recuperada uma menor quantidade de CFUs em células IDO1^{-/-} desafiadas com Kp 100, em comparação às tratadas com o antimicrobiano (figura 17 E). Porém, não houve variação percentual de CFUs entre 2 e 1 hora de incubação (figura 17 F). Além disso, para células IDO1^{-/-}, a exposição a imipenem não afetou a recuperação de CFUs após duas horas, o que resultou num aumento de 200% no número de CFUs entre 2 e 1 hora de desafio (figuras 17 E e F). Em conjunto, esses resultados sugerem que a fagocitose sensibiliza a amostra Kp 100 a imipenem em células selvagens, mas não em células deficientes para IDO1.

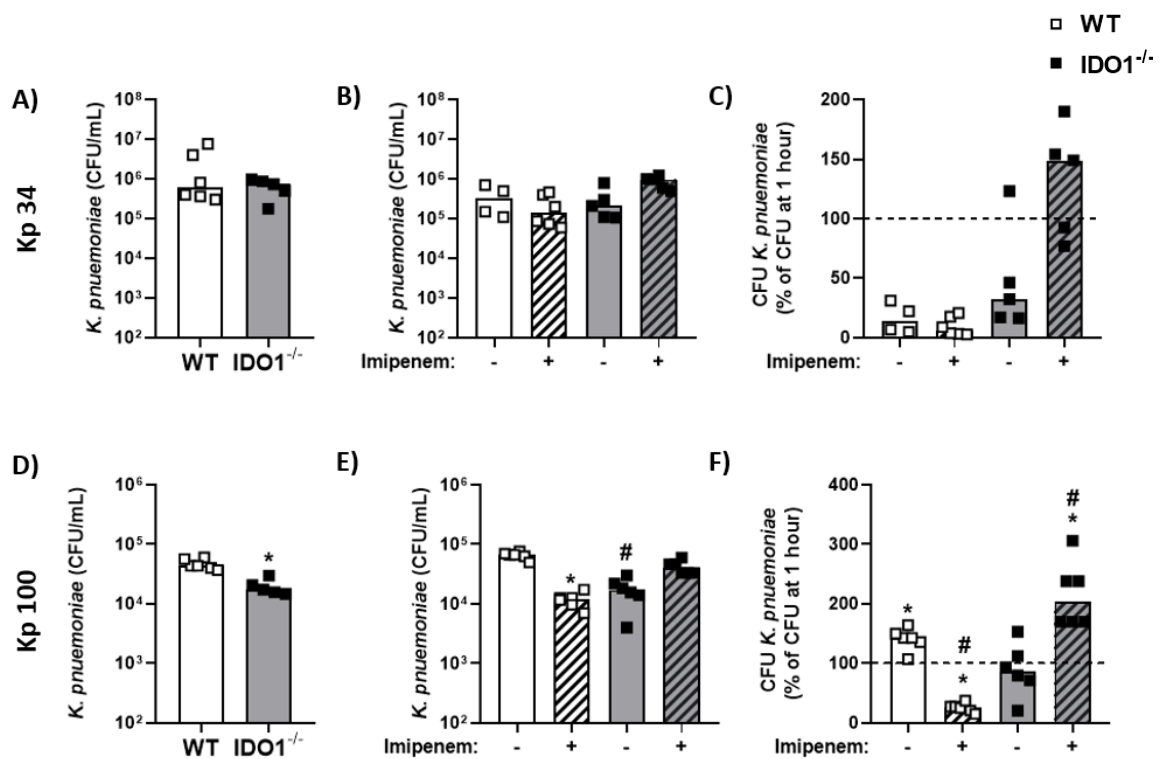


Figura 17: Determinação da taxa fagocitose e recuperação de *K. pneumoniae* fagocitadas por macrófagos. A análise estatística foi realizada através do teste ANOVA one way. Valores de * $p < 0,05$ foram estatisticamente significativos em comparação à mesma linhagem celular sem imipem. # $p < 0,05$ foram significativos em comparação a CFU/ml da mesma linhagem em D.

6 DISCUSSÃO

A avaliação situacional de IRAS no HRTN vai ao encontro ao observado em âmbito global, no aspecto microrganismos e perfis de resistência de maior relevância (HUERTA-GUTIÉRREZ et al., 2019; WHO, 2014a). Quatro dos microrganismos de maior frequência no HRTN foram bacilos Gram-negativos, sendo os dois mais frequentes (*E. coli* e *K. pneumoniae*) representantes da família *Enterobacteriaceae*. No que diz respeito ao perfil de resistência, o grupo CRE (*Enterobacteriaceae* Resistente a Carbapenêmicos), representado por *K. pneumoniae* KPC, e ESBL-PE (*Enterobacteriaceae* Produtora de β -lactamases de Espectro Estendido), representado por *E. coli* ESBL, também foram os mais frequentes no hospital. Não surpreendentemente, os perfis de resistência mais frequentes no hospital foram também os que impactaram de maneira significativa o número de óbitos no hospital.

Os microrganismos mais frequentes apresentaram também maior número bruto de óbitos no hospital. Entretanto, ao atentar para a frequência relativa de óbitos, gêneros pouco frequentes como *Streptococcus* e *Stenotrophomonas* apresentam uma frequência relativa de óbitos maior que a do hospital como um todo, o que poderia ser atribuído a maior taxa de mortalidade de infecções por microrganismos. Enquanto *Escherichia*, ainda que cerca de 40% de seus isolados tenha sido multirresistentes, apresentou uma frequência relativa de óbitos menor que a do hospital, sugerindo uma menor taxa de mortalidade atribuída a infecções por esse microrganismo. A esse respeito, seria interessante e necessário investigar o perfil dos pacientes dos quais *Streptococcus* e *Escherichia* foram isolados. Aspectos como idade, tempo de internação, topografia ou sítio de infecção poderiam justificar o maior ou menor risco desses pacientes.

Ao estratificar a avaliação situacional de IRAS, o CTI se mostrou um setor representativo do hospital como um todo, ao se assemelharem quanto a características como sexo dos pacientes e distribuição de microrganismos e perfis de resistência. O tempo médio de internação, contudo, foi maior no CTI, o que pode ter impactado significativamente na maior frequência de óbitos nesse setor, em comparação ao hospital. O que pode ser justificada pela maior vulnerabilidade de paciente sob terapia intensiva, associada a procedimentos invasivos, tempo

prolongado sob antibioticoterapia e, portanto, maior susceptibilidade a infecções por microrganismos resistentes (WHO, 2009).

À vista do apresentado, estudar isolados de *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenêmicos proveniente de pacientes internados no CTI se mostra relevante e coerente dentro do contexto de IRAS e multirresistência no cenário global e local.

Os isolados se assemelham quanto a características fenotípicas, como o metabolismo e perfil de sensibilidade a antimicrobianos. Todos se mostraram resistentes a ampicilina, o que em *K. pneumoniae* é uma característica intrínseca (WOODFORD *et al.*, 2004; WYRES and HOLT *et al.*, 2018), a ciprofloxacino e a imipenem. A resistência a carbapenêmicos compartilhada pelos isolados pode ser atribuída ao gene de resistência *bla_{KPC}*, haja vista que todos o carregam.

Os isolados apresentaram grande diversidade genética como demonstrado pelos diversos filogrupos obtidos após a análise baseada em ERIC-PCR. A técnica de ERIC-PCR utiliza a quantidade e tamanho das sequências consenso amplificadas como marcadores genéticos (*fingerprint*) de isolados bacterianos para avaliar sua diversidade. Trata-se de um método empregado em estudos de enterobactérias, como *K. pneumoniae*, desde a década de noventa (BARUS *et al.*, 2013; CABRAL *et al.*, 2012). No entanto, diferentemente desses, a quantidade de bandas observadas nos produtos de amplificação dos isolados de *K. pneumoniae* MDR foi consideravelmente menor, e conseqüentemente menor a quantidade de parâmetros utilizada para o agrupamento dos isolados em filogrupos. É possível ainda que bandas pouco evidentes estejam aquém da sensibilidade do programa utilizado para a construção do dendograma, resultando em uma maior quantidade de filogrupos.

Ainda assim, a diversidade genética observada entre os isolados, somado à presença do gene *bla_{KPC}* em todos eles, chama a atenção para disseminação de genes de resistência em ambientes de assistência à saúde. Sendo o gene *bla_{KPC}* um gene encontrado em diferentes plasmídeos e disperso entre enterobactérias, a possibilidade de disseminação horizontal adverte para a emergência de multirresistência dentro do contexto de IRAS (LUTGRING *et al.*, 2016; WYRES and HOLT *et al.*, 2018;).

Tendo em vista a caracterização fenotípica e genotípica dos isolados, para os ensaios subsequentes com macrófagos *in vitro*, o isolado 100 foi escolhido por estar mais próximo filogeneticamente da linhagem de referência utilizada ATCC 13883, e se distinguir metabolicamente da maioria dos isolados, por fermentar sacarose. Já o isolado 34 apresentava perfil metabólico similar à maioria dos isolados, no entanto compartilhava de menor identidade com as linhagens de referência.

Dentro do conceito de Terapias Direcionadas ao Hospedeiro (HDT), os ensaios subsequentes objetivaram avaliar a ativação de macrófagos frente à infecção bacteriana. Inicialmente, duas linhagens celulares selvagens, murina e humana, foram submetidas ao protocolo de ativação clássica de macrófagos, com LPS e IFN γ , e, em seguida, desafiadas com a linhagem de referência de *K. pneumoniae*. O protocolo foi capaz de aumentar a produção de ROS em BMDM WT, mas não em M-THP1, e não alterou o índice fagocítico em nenhum dos dois tipos celulares. Assim, BMDM foi a linhagem celular de escolha e o próximo passo foi atestar que a ativação altera o fenótipo de expressão de moléculas associadas a polarização M1, sem comprometer a viabilidade celular.

Porém, quando BMDMs WT ativados e não ativados foram desafiados com os isolados clínicos de escolha, o fenótipo observado não foi o mesmo para os dois isolados. A amostra 34 pareceu mais susceptível à fagocitose do que a amostra 100, já que houve diminuição do número de UFCs entre os tempos de 2 e 1 pós-desafio para células não ativadas. Ao passo que para a amostra 100, houve aumento do número de UFCs entre os dois *time points*. Entretanto, a ativação não aumentou o *killing* de bactérias fagocitadas para nenhuma das amostras testada e, por isso, o protocolo de ativação foi descontinuado para os ensaios subsequentes.

A fim de avaliar o envolvimento da enzima IDO1 em macrófagos frente à infecção por bactérias multidroga-resistentes, BMDM deficientes para a isoforma IDO1 foram, primeiramente, caracterizados quanto a expressão de marcadores de superfície e produção de ROS. Em comparação a BMDM WT, macrófagos IDO1 $^{-/-}$ apresentaram perfil de menor expressão de um dos marcadores de polarização M1 (MHC-II), maior expressão de outro (CD80) e maior da expressão de ROS.

Quando BMDM IDO1^{-/-} foram então desafiadas com os dois isolados clínicos, na ausência e presença de imipenem, a taxa de fagocitose foi menor somente para o isolado 100 em células deficientes para IDO1. Sendo que a ausência de IDO1 não parece alterar significativamente o killing de ambos isolados por BMDM. Para o isolado 100, a fagocitose sensibilizou a bactéria ao imipenem em células selvagens, o que se deu de maneira independente da ativação celular prévia, e dependente da expressão de IDO1. A ressensibilização, porém, parece não acontecer de forma dependente da produção basal de ROS, uma vez que células IDO1^{-/-}, que produzem mais ROS foram incapazes de sensibilizar a amostra 100.

REKHA e colaboradores, em seu estudo sobre a ressensibilização de bactérias MDR (REKHA *et al.*, 2020), utilizam de outras moléculas estimuladoras que promovem a modulação do sistema imune por ativação de mecanismos efetores inatos, não só a produção de ROS, como indução de autofagia, indução da síntese de peptídeos antimicrobianos. Dessa forma, os achados preliminares do presente estudo apontam que IDO pode estar envolvido nessas vias de modulação.

Como IDO1 controla a depleção de triptofano ao convertê-lo em quinurenina, uma hipótese possível é que a depleção de triptofano, ou a síntese de quinurenina, podem ser os efetores da sensibilização da amostra 100 a imipenem. Para isso, ainda é preciso investigar o papel da bactéria, visto que *Klebsiella* é capaz de metabolizar TRP em indol-acético (KAUR *et al.*, 2019) e então avaliar se a sensibilização é restabelecida em células IDO1^{-/-} pela adição de quinurenina ou pela depleção de triptofano, através da realização dos ensaios em meio livre de triptofano.

7 CONCLUSÃO

No ano de 2019, o HRTN foi um retrato do cenário mundial quanto à situação de IRAS e a MDR, colocando em evidência e reafirmando a importância da família *Enterobacteriaceae*. Nesse contexto, os Centros de Terapia Intensiva representam um setor de grande importância ao albergar um maior tempo de internação e impactar significativamente na frequência de óbitos. Ao caracterizar isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* multidroga-resistente oriundos do CTI, a diversidade genética e a presença disseminada do gene móvel de resistência *bla_{KPC}* em todas as amostras, ressaltam a importância dessa bactéria em IRAS e na emergência de multirresistência.

À vista disso o trabalho se propôs estudar o envolvimento do metabolismo de triptofano, cujos metabólitos desempenham papéis já descritos na imunomodulação, em macrófagos na sensibilização a carbapenêmicos de amostras de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenêmicos (KPC) isoladas de pacientes acometidos por IRAS e internados do CTI do HRTN em 2019.

Para avaliação de mecanismos envolvidos na ressensibilização de amostras multirresistentes a antimicrobianos, foi estabelecido um protocolo de estudo com macrófagos derivados de medula óssea de camundongos selvagens e deficientes para enzima IDO1. Constatou-se que um dos isolados MDR de *K. pneumoniae* foi ressensibilizado ao antimicrobiano em células selvagens e esse fenômeno se deu de maneira independente da ativação celular prévia, dependente da expressão de IDO1 e, aparentemente, de forma não dependente da produção de ROS. Por meio desse protocolo, será possível avaliar futuramente o papel a via das quinureninas na ressensibilização de isolados multirresistentes a antimicrobianos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUS, Allison; PLANCHAIS, Julien; SOKOL, Harry. Gut Microbiota Regulation of Tryptophan Metabolism in Health and Disease. **Cell Host & Microbe**, [S.L.], v. 23, n. 6, p. 716-724, jun. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2018.05.003>.

AKOVA, Murat. Epidemiology of antimicrobial resistance in bloodstream infections. *Virulence*, [S.L.], v. 7, n. 3, p. 252-266, 16 mar. 2016. **Informa UK Limited**. <http://dx.doi.org/10.1080/21505594.2016.1159366>.

ALLEGIANZI, Benedetta; NEJAD, Sepideh Bagheri; COMBESCURE, Christophe; GRAAFMANS, Wilco; ATTAR, Homa; DONALDSON, Liam; PITTET, Didier. Burden of endemic health-care-associated infection in developing countries: systematic review and meta-analysis. **The Lancet**, [S.L.], v. 377, n. 9761, p. 228-241, jan. 2011. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(10\)61458-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(10)61458-4).

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Anvisa intensifica controle de infecção em serviços de saúde. **Revista de Saúde Pública**, [S.L.], v. 38, n. 3, p. 475-478, jun. 2004. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0034-89102004000300022>.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Antimicrobianos – Bases Teóricas e Uso Clínico**. 2007. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosauade/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/bibliografia.htm. Acesso em: 9 out. 2020.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Boletim Informativo: Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde**. Avaliação dos indicadores nacionais de infecção relacionada à assistência ano de 2015 e relatório de progresso. n. 14, p. 1–83, 2016a.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Critérios Diagnósticos de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde**. In: SANITÁRIA, Agência Nacional de Vigilância. **Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde**. Brasil: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2013. Cap. 2.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa Nacional de Prevenção e Controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (PNPCIRAS) 2016 – 2020**. 2016b.

ANVISA, Gerência de Vigilância e Monitoramento em Serviços de Saúde. **Plano Nacional para a Prevenção e o Controle da Resistência Microbiana nos Serviços de Saúde**. Brasília: Anvisa, 2019. 84 p. Disponível em: <https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/item/plano->

nacional-para-a-prevencao-e-o-controle-da-resistencia-microbiana-nos-servicos-de-saude. Acesso em: 07 out. 2020.

ARAÚJO, B. T.; PEREIRA, D. C. R. Políticas para controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) no Brasil. **Comunicação em Ciências da Saúde**, [S. l.], v. 28, n. 03/04, p. 333-342, 2018. Disponível em: <<http://www.escs.edu.br/revistaccs/index.php/comunicacaoemcienciasdasaude/articloe/view/275>> Acesso em: 16 set. 2020.

BARUST., Hanjayai., SADELIJ., Layb.W., SUWANTOA. and YULANDIA. Genetic Diversity of *Klebsiella* spp. Isolated from Tempe based on Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-Polymerase Chain Reaction (ERIC-PCR). **HAYATI Journal of Biosciences**. v.20, 4 Dec. 2013, 171-176. DOI:<https://doi.org/10.4308/hjb.20.4.171-176>.

BENOIT, Marie; DESNUES, Benoît; MEGE, Jean-Louis. Macrophage Polarization in Bacterial Infections. **The Journal Of Immunology**, [S.L.], v. 181, n. 6, p. 3733-3739, 3 set. 2008. The American Association of Immunologists. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.181.6.3733>. Troy D. Hubbard, Iain A. Murray and Gary H. Perdew. Drug Metabolism and Disposition October 1, 2015, 43 (10) 1522-1535; DOI: <https://doi.org/10.1124/dmd.115.064246>.

BESSEDE, Alban et al. Aryl hydrocarbon receptor control of a disease tolerance defense pathway. **Nature**, NIH, v. 511, ed. 7508, p. 184–190, 10 jul. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde - Portaria nº. 2616, de 12 de maio de 1998. Institui a obrigatoriedade de manutenção pelos hospitais do país, de *programa* de controle de Infecção Hospitalares. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, de 13 maio 1998.

BUSH, Karen; FISHER, Jed F.. Epidemiological Expansion, Structural Studies, and Clinical Challenges of New β -Lactamases from Gram-Negative Bacteria. **Annual Review Of Microbiology**, [S.L.], v. 65, n. 1, p. 455-478, 13 out. 2011. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102911>.

Cabral, A. B., Melo, R. de C. de A., Maciel, M. A. V., & Lopes, A. C. S. Multidrug resistance genes, including blaKPC and blaCTX-M-2, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil. **Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2012, 45(5), 572–578. doi:10.1590/s0037-86822012000500007

CDC, Centers for Disease Control and Prevention: **Antibiotic Resistance Threats in the United States**, 2019a. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention; Available at: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threatsreport/2019-ar-threats-report-508.pdf>.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention. **Healthcare-associated Infections: diseases and organisms in healthcare settings**. 2019b. Disponível em: <https://www.cdc.gov/hai/organisms/organisms.html#>. Acesso em: 17 set. 2020.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention. **National Shiga Toxin-producing Escherichia coli (STEC) Surveillance**. 2016. Disponível em: <https://www.cdc.gov/ecoli/surveillance.html>. Acesso em: 10 out. 2020.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention. **Klebsiella pneumoniae in Healthcare Settings**. 2010. Disponível em: <https://www.cdc.gov/hai/organisms/klebsiella/klebsiella.html>. Acesso em: 24 set. 2022.

Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 27th informational supplement**. CLSI M100-S27 Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2022a.

Clinical and Laboratory Standards Institute. **Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria that grow aerobically; Approved Standard - Tenth edition**. CLSI M107-A27 Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2022b

CREMESP, CONSELHO REGIONAL DE MEDICINA DO ESTADO DE SÃO PAULO. O Controle da Infecção Hospitalar no Estado de São Paulo. São Paulo: **Ministério Público do Estado de São Paulo (MPSP)**, 2010. p.164.

DEHHAGHI, Mona et al. Microorganisms, Tryptophan Metabolism, and Kynurenine Pathway: A Complex Interconnected Loop Influencing Human Health Status. **International Journal of Tryptophan Research**, [s. l.], v. 12, p. 1-10, 10 abr. 2019. <https://doi.org/10.1177/1178646919852996>

DOMINGUES, Sara; SILVA, Gabriela J. da; NIELSEN, Kaare M.. Integrins. **Mobile Genetic Elements**, [S.L.], v. 2, n. 5, p. 211-223, set. 2012. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.4161/mge.22967>. The antimicrobial resistance crisis: causes, consequences, and management.

ECDC, European Centre for Disease Prevention and Control. **EXECUTIVE SCIENCE UPDATE: European Centre for Disease Prevention and Control quarterly newsletter for policymakers**. Europe, jan. 2009.

EDWARDS, Jonathan R.; PETERSON, Kelly D.; ANDRUS, Mary L.; DUDECK, Margaret A.; POLLOCK, Daniel A.; HORAN, Teresa C.. National Healthcare Safety Network (NHSN) Report, data summary for 2006 through 2007, issued November 2008. **American Journal of Infection Control**, [S.L.], v. 36, n. 9, p. 609-626, nov. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajic.2008.08.001>.

GARNER, Julia S.; JARVIS, William R.; EMORI, T.Grace; HORAN, Teresa C.; HUGHES, James M. CDC definitions for nosocomial infections, 1988. **American Journal of Infection Control**, [S.L.], v. 16, n. 3, p. 128-140, jun. 1988. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0196-6553\(88\)90053-3](http://dx.doi.org/10.1016/0196-6553(88)90053-3).

GRIMONT, P.A. and GRIMONT, F. (2015). Klebsiella. In **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria** (eds M.E. Trujillo, S. Dedysh, P. DeVos, B. Hedlund, P. Kämpfer, F.A. Rainey and W.B. Whitman). <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01150>

GUIMARÃES, Denise Oliveira; MOMESSO, Luciano da Silva; PUPO, Mônica Tallarico. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, [S.L.], v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422010000300035>.

GUTIÉRREZ-VÁZQUEZ, Cristina; QUINTANA, Francisco J. Regulation of the Immune Response by the Aryl Hydrocarbon Receptor. **Cell Press**, Cambridge, MA, USA, v. 48, Issue 1, p. 19-33, 16 jan. 2018.

HANSON, N. D.. AmpC β -lactamases: what do we need to know for the future?. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, [S.L.], v. 52, n. 1, p. 2-4, 12 jun. 2003. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkg284>.

HIDRON, Alicia I. et al. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: annual summary of data reported to the national healthcare safety network at the centers for disease control and prevention, 2006-2007. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, [S.L.], v. 29, n. 11, p. 996-1011, nov. 2008. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1086/591861>.

HORAN, Teresa C. et al. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. **American Journal of Infection Control**, [S.L.], v. 36, n. 5, p. 309-332, jun. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajic.2008.03.002>.

HOSPITAL RISOLETA TOLENTINO NEVES (Belo Horizonte). **Início**: institucional. Institucional. Disponível em: http://www.hrtm.fundep.ufmg.br/index.php?option=com_content&task=view&id=161&Itemid=86. Acesso em: 2 nov. 2020.

HUBBARD TD, MURRAY IA, PERDEW GH; Indole and Tryptophan Metabolism: Endogenous and Dietary Routes to Ah Receptor Activation. **Drug Metabolism and Disposition**, 2015. v. 43, n. 10, p. 1522-1535.

HUERTA-GUTIÉRREZ, R. et al. One-day point prevalence of healthcare-associated infections and antimicrobial use in four countries in Latin America. **International**

Journal of Infectious Diseases, [S.L.], v. 86, p. 157-166, set. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2019.06.016>.

IREDELL, Jon; BROWN, Jeremy; TAGG, Kaitlin. Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: mechanisms and clinical implications. **Bmj**, [S.L.], p. 352, 8 fev. 2016. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.h6420>.

KAUFMANN, Stefan H. E.; DORHOI, Anca; HOTCHKISS, Richard S.; BARTENSCHLAGER, Ralf. Host-directed therapies for bacterial and viral infections. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S.L.], v. 17, n. 1, p. 35-56, 22 set. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd.2017.162>.

KHAN, Arshad; SINGH, Vipul Kumar; HUNTER, Robert L.; JAGANNATH, Chinnaswamy. Macrophage heterogeneity and plasticity in tuberculosis. **Journal Of Leukocyte Biology**, [S.L.], v. 106, n. 2, p. 275-282, 2 abr. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jlb.mr0318-095rr>.

KAUR H; BOSE C; MANDE S; Tryptophan Metabolism by Gut Microbiome and Gut-Brain-Axis: An in silico Analysis. **Front Neurosci**, 13:1365, 2019 Dec 18. doi:10.3389/fnins.2019.01365

LUTGRING, Joseph D.; LIMBAGO, Brandi M.. The Problem of Carbapenemase-Producing-Carbapenem-Resistant-Enterobacteriaceae Detection. **Journal Of Clinical Microbiology**, [S.L.], v. 54, n. 3, p. 529-534, 6 jan. 2016. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.02771-15>.

MADIGAN, Michael et al. Microbiologia diagnóstica: fármacos antimicrobianos. In: MADIGAN, Michael; MARTINKO, John; BENDER, Kelly; BUCKLEY, Daniel; STAHL, David. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. São Paulo: Pearson Education,inc, 2016. Cap. 27. p. 811-818.

MAEURER, Markus; RAO, Martin; ZUMLA, Alimuddin. Host-directed therapies for antimicrobial resistant respiratory tract infections. **Current Opinion In Pulmonary Medicine**, [S.L.], v. 22, n. 3, p. 203-211, maio 2016. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/mcp.0000000000000271>.

MICHAEL, Carolyn Anne; DOMINEY-HOWES, Dale; LABBATE, Maurizio. The Antimicrobial Resistance Crisis: causes, consequences, and management. **Frontiers In Public Health**, [S.L.], v. 2, p. 145, 16 set. 2014. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fpubh.2014.00145>.

Ministério da Saúde. ANVISA: **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde**. Edição Comemorativa para o IX Congresso Brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar, Salvador, 2004.

Ministério da Saúde. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC 50– Regulamento técnico para planejamento, programação, elaboração e avaliação de projetos físicos de estabelecimento de assistência à saúde**, 2002. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br.html>>. Acesso em: 19. jun.2009.

Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012. Diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil**: 150.112 (2013).

MOURA-ALVES, Pedro; FAÉ, Kellen; HOUTHUYS, Erica; DORHOI, Anca; KREUCHWIG, Annika; FURKERT, Jens; BARISON, Nicola; DIEHL, Anne; MUNDER, Antje; CONSTANT, Patricia. AhR sensing of bacterial pigments regulates antibacterial defence. **Nature**, [S.L.], v. 512, n. 7515, p. 387-392, ago. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature13684>.

MURRAY, Patrick; ROSENTHAL, Ken; PFALLER, Michael. ANTIBACTERIAL AGENTS. In: MURRAY, Patrick; ROSENTHAL, Ken. **Medical Microbiology**. 8. ed. Philadelphia: Elsevier Inc., 2016. p. 162-264.

NATARO, James. Enteroaggregative Escherichia coli. *Emerging Infectious Diseases*, [S.L.], v. 4, n. 2, p. 251-261, jun. 1998. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). <http://dx.doi.org/10.3201/eid0402.980212>.

NNIS, National Nosocomial Infections Surveillance. National Nosocomial Infections Surveillance System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. **Am J Infect Control**, v. 32, n. 8, p. 470-485, dez. 2004.

NOFTALL, K; TAYLOR, M; HOANG, L; GALANIS, E. Shiga toxin–producing Escherichia coli in British Columbia, 2011–2017: analysis to inform exclusion guidelines. **Canada Communicable Disease Report**, [S.L.], v. 45, n. 9, p. 238-243, 5 set. 2019. IDPCB, Infectious Disease and Control Branch. Public Health Agency of Canada. <http://dx.doi.org/10.14745/ccdr.v45i09a03>.

PAO, Organização Pan-Americana da Saúde; Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual para observadores: estratégia multimodal da OMS para a melhoria da higienização das mãos**. 2008. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_docman&view=document&layout=default&alias=497-manual-para-observadores-7&category_slug=seguranca-do-paciente-970&Itemid=965> Acesso em: 10 out. 2020.

Scott II R. D.. **The Direct medical costs of healthcare-associated infections in U.S. hospitals and the benefits of prevention**. United States: Centers For Disease Control And Prevention, 2009.

REKHA, Rokeya Sultana *et al.* Innate Effector Systems in Primary Human Macrophages Sensitize Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* to Antibiotics. **Infection And Immunity**, [S.L.], v. 88, n. 8, 8 jun. 2020. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.00186-20>.

REVELAS, Angela. Healthcare - associated infections: a public health problem. **Nigerian Medical Journal**, [S.L.], v. 53, n. 2, p. 59, 2012. Medknow. <http://dx.doi.org/10.4103/0300-1652.103543>.

RICE, Louis B.. Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: no escape. **The Journal Of Infectious Diseases**, [S.L.], v. 197, n. 8, p. 1079-1081, 15 abr. 2008. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1086/533452>.

ROAGER, Henrik M.; LICHT, Tine R.. Microbial tryptophan catabolites in health and disease. **Nature Communications**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 0-0, 17 ago. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-05470-4>.

ROOKS, Michelle G.; GARRETT, Wendy S.. Gut microbiota, metabolites and host immunity. **Nature Reviews Immunology**, [S.L.], v. 16, n. 6, p. 341-352, 27 maio 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nri.2016.42>.

SANTOS, Adélia A.; LOPES, Flávia F.P.; CARDOSO Regina A.; *et al.* Diagnóstico do controle da infecção hospitalar no Brasil. *Programa de pesquisas hospitalares em busca de excelência: fortalecendo o desempenho hospitalar no brasil*. Brasília: **Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Banco Mundial**. 2005.

SILVER, L. L.. Challenges of Antibacterial Discovery. **Clinical Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 24, n. 1, p. 71-109, 1 jan. 2011. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.00030-10>.

STOCKS, Claudia J.; SCHEMBRI, Mark A.; SWEET, Matthew J.; KAPETANOVIC, Ronan. For when bacterial infections persist: toll-like receptor-inducible direct antimicrobial pathways in macrophages. **Journal Of Leukocyte Biology**, [S.L.], v. 103, n. 1, p. 35-51, jan. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jlb.4ri0917-358r>.

SUAY-GARCÍA; PÉREZ-GRACIA. Present and Future of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) Infections. **Antibiotics**, [S.L.], v. 8, n. 3, p. 122, 19 ago. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/antibiotics8030122>.

TALEB, Soraya. Tryptophan Dietary Impacts Gut Barrier and Metabolic Diseases. **Frontiers in Immunology: Mucosal Immunity**, Paris, France, v. 10, 10 set. 2019.

Trimble, M.J *et al.* "Polymyxin: Alternative Mechanisms of Action and Resistance." **Cold Spring Harbor perspectives in medicine** vol. 6,10 a025288. 3 Oct. 2016, doi:10.1101/cshperspect.a025288

VAN DER ZEE A, STEER N, THIJSSSEN E et al. Use of multienzyme multiplex PCR amplified fragment length polymorphism typing in analysis of outbreaks of multiresistant *Klebsiella pneumoniae* in an intensive care unit. **J Clin Microbiol**, 2003, 41:798-802. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.2.798-802.2003>

VORDERSTRASSE, Beth A.; LAWRENCE, B. Paige. Protection against Lethal Challenge with *Streptococcus pneumoniae* Is Conferred by Aryl Hydrocarbon Receptor Activation but Is Not Associated with an Enhanced Inflammatory Response. **Infection And Immunity**, [S.L.], v. 74, n. 10, p. 5679-5686, out. 2006. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.00837-06>.

VENTOLA, C. L.. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. **P & T: a peer-reviewed journal for formulary management**, v. 40, n. 4, p. 277-83, 2015.

VINCENT, Jean-Louis, et al. International Study of the Prevalence and Outcomes of Infection in Intensive Care Units. *Jama*, [S.L.], v. 302, n. 21, p. 2323-2323, 2 dez. 2009. **American Medical Association (AMA)**. <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2009.1754>.

ZELANTE, Teresa et al. Tryptophan Catabolites from Microbiota Engage Aryl Hydrocarbon Receptor and Balance Mucosal Reactivity via Interleukin-22. **Cell Press**, [s. l.], v. 39, p. 372-385, 22 out. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.08.003>.

ZHANG D, FRENETTE PS; Cross talk between neutrophils and the microbiota. **Blood**. 2019 May 16;133(20):2168-2177. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-11-844555>.

WEINER-LASTINGER, Lindsey M. et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with adult healthcare-associated infections: summary of data reported to the national healthcare safety network, 2015-2017. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, [S.L.], v. 41, n. 1, p. 1-18, 26 nov. 2019. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/ice.2019.296>.

WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. **World Health Organization**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>> Acesso em: 29 setembro 2020.

WHO, **World Health Organization**. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. 2014a; p. 9-30. Disponível em <<https://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>>. Acesso em 20 set. 2020.

WHO, **World Health Organization**. Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. 2015a. Disponível em: <http://www.wpro.who.int/entity/drug_resistance/resources/global_action_plan_eng.pdf> Acesso em 16 set. 2020.

WHO, World Health Organization. Guidelines on Hand Hygiene in Health Care: First Global Patient Safety Challenge Clean Care Is Safer Care Chapter 3. **World Health Organization** Geneva: 2009. Disponível em: <<https://www.who.int/infection-prevention/publications/ipc-components-guidelines/en/>>. Acesso em 17 set. 2020.

WHO, World Health Organization. **Health care-associated infections: Fact Sheet**. 2014b. Disponível em: <http://www.who.int/gpsc/country_work/gpsc_ccisc_fact_sheet_en.pdf> Acesso em: 17 set. 2020.

WHO, World Health Organization. Prevention of hospital-acquired infections: A practical guide 2nd. ed. Geneva, Switzerland : **World Health Organization**. 2002. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/67350>> Acesso em 18 set. 2020.

WHO, World Health Organization. **Report on the burden of endemic health care-associated infection worldwide**. WHO Press. 2011. Disponível em: <https://www.who.int/infection-prevention/publications/burden_hcai/en/> Acesso em 16 set. 2020.

WHO, World Health Organization. **Worldwide country situation analysis: response to antimicrobial resistance**. WHO Press [Internet]. 2015b; (April):1–50. Disponível em: <<http://www.who.int/drugresistance/documents/situationanalysis/en/>> Acesso em 19 set. 2020.

WHO, World Health Organization. **Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) report: early implementation 2019-2018**. WHO Press. 2018. Disponível em: <<https://www.who.int/glass/resources/publications/early-implementation-report/en/>> Acesso em 16 set. 2020.

WYNN, T. A.; CHAWLA, A.; POLLARD, J.W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. **Nature**, [S.L.], v. 496, n. 7446, p. 445-455, abr. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature12034>.

WOODFORD N, TIerno PM Jr, YOUNG K, *et al*. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. **Antimicrob Agents Chemother**. 2004;48(12):4793-4799. doi:10.1128/AAC.48.12.4793-4799.2004

WYRES AND HOLT KL, *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. **Curr Opin Microbiol**. 2018 Oct;45:131-139. doi: 10.1016/j.mib.2018.04.004.

ANEXO I – Parecer CEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Impacto da via das quinureninas no controle de bactérias multidroga resistentes por macrófagos in vitro.

Pesquisador: CAIO TAVARES FAGUNDES

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 52924621.1.0000.5149

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Patrocinador Principal: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.224.765

Apresentação do Projeto:

Trata-se de estudo análise retrospectiva da prevalência e do perfil de resistência de bactérias multirresistentes isoladas no Hospital Risoleta Tolentino Neves no ano de 2019. O objetivo geral apresentado é avaliar o efeito de metabólitos de triptofano em macrófagos sobre o controle da infecção por enterobactérias multirresistentes prevalentes em infecções relacionadas a assistência à saúde, bem como sobre a sensibilidade dessas a antimicrobianos. Os dados a serem coletados envolverão infecções hospitalares por bactérias multidroga-resistentes registrados no período de Janeiro a Dezembro de 2019. A fim de definir a amostra alvo do estudo, uma avaliação da ocorrência, distribuição e perfil de resistência de bactérias a antimicrobianos no hospital em questão será conduzida. Posteriormente, ensaios de fagocitose e killing com macrófagos e de interferência na resistência a antimicrobianos nas bactérias de escolha serão padronizados. Por fim, a avaliação do efeito da via das quinureninas em macrófagos derivados de linhagens imortalizadas de monócitos se dará por meio da incubação com kinurenina, na presença ou ausência de um antagonista de AHR (alfa-naftoflavona), ou com inibidor de IDO1 (1-metiltryptofano).

Endereço: Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 e 2º. Andar e Sala 2005 e Campus Pampulha

Bairro: Unidade Administrativa II

CEP: 31.270-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 5.224.765

Objetivo da Pesquisa:

Responder às diligências apresentadas pelo CEP.

Objetivo Primário:

Avaliar o efeito do metabolismo do triptofano sobre a resposta de macrófagos a bactérias multirresistentes prevalentes provenientes de isolados clínicos do Hospital Risoleta Tolentino Neves.

Objetivo Secundário:

- Avaliar a ocorrência, a distribuição e o perfil de resistência dos microrganismos aos antimicrobianos em infecções relacionadas a saúde, em um hospital da rede pública de BH;
- Estabelecer quais amostras de bactérias MDR prevalentes serão utilizadas nos passos subsequentes do estudo;
- Padronizar dos ensaios de fagocitose e killing com macrófagos (pré-ativados ou não);- Estabelecer os ensaios de interferência na resistência de bactérias MDR a antimicrobianos;
- Avaliar o efeito da ativação de AHR sobre os fenômenos acima descritos por meio da incubação de macrófagos com quinurenina, na presença ou ausência de um antagonista de AHR (alfa-naftoflavona);
- Avaliar o papel da IDO1 nos fenômenos acima descritos por meio da incubação de macrófagos com inibidor de IDO1 (1-metil-triptofano).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos e Benefícios apresentados:

Riscos: Por se tratar de um estudo retrospectivo, realizado com amostras armazenadas da rotina hospitalar, já em fase de descarte, não há qualquer risco individual ou outro risco coletivo, com exceção daquele referente à exposição ao microrganismo no momento da coleta das placas contendo as bactérias. Para minimizar esse risco, o pesquisador usará todos os equipamentos de proteção individual e de biossegurança relativos ao transporte das placas e manipulação das mesmas no laboratório.

Benefícios:

Em relação aos possíveis benefícios da pesquisa, os resultados das análises epidemiológicas, além de gerar dados úteis ao tratamento dos pacientes, poderão contribuir no delineamento de novas estratégias para os programas de controle de infecção hospitalar da instituição participante. Ainda, os resultados dos ensaios com macrófagos fornecerão relevante prova de conceito que respaldarão novos estudos pré-clínicos com células humanas primárias e em modelos

Endereço: Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2º. Andar 2 Sala 2005 2 Campus Pampulha
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 5.224.765

experimentais animais.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de estudo análise retrospectiva da prevalência e do perfil de resistência de bactérias multirresistentes isoladas no Hospital Risoleta Tolentino Neves no ano de 2019.

Nesta versão os pesquisadores apresentam respostas às diligências apresentadas pelo CEP, como a seguir:

Recomendações:

1-Recomenda-se descrever riscos aos participantes, mesmo que mínimos (de acordo com a Res. 466/12 não existe pesquisa sem risco) e os procedimentos para minimizá-los. Descrever, por exemplo, os possíveis riscos de quebra de sigilo do participante nos quais as amostras bacterianas serão coletadas e apontar as medidas para minimizar estes riscos.

Resposta: No campo destinado a descrição dos riscos do formulário eletrônico foram descritos os riscos de quebra de sigilo dos participantes, bem como as medidas a serem adotadas para minimizarem esses riscos. Agora, o texto presente nesse campo é o seguinte:

"Por se tratar de um estudo retrospectivo, realizado com amostras armazenadas da rotina hospitalar, já em fase de descarte, não há qualquer risco individual ou outro risco coletivo, com exceção daquele referente à exposição ao microrganismo no momento da coleta das placas contendo as bactérias, além dos riscos relacionados à segurança das informações clínicas, quebra de sigilo ou invasão da privacidade. Para minimizar os primeiros riscos, o pesquisador usará todos os equipamentos de proteção individual e de biossegurança relativos ao transporte das placas e manipulação das mesmas no laboratório. Para minimizar os riscos acerca da segurança das informações, serão utilizados códigos para identificação de cada participante assegurando seu anonimato; o acesso às fichas clínicas será limitado apenas pelo tempo, quantidade e qualidade das informações específicas para a pesquisa, garantindo a não violação e a integridade dos documentos (danos físicos, cópias, rasuras) e assegurado a confidencialidade e a privacidade."

2-Existe consulta de prontuários recentes 2019 e mesmo o trabalho sendo retrospectivo, tem que ser solicitado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Com a Resolução CNS 510/16, se faz possível a obtenção do consentimento por outras vias (ex: telefone, email), possibilitando o recrutamento.

Resposta: À luz da resolução 510/16 que autoriza a obtenção de consentimento por vias alternativas, o que favorece o recrutamento retrospectivo, incluímos a solicitação de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) aos participantes do projeto. O modelo do TCLE foi anexado ao sistema sob o nome "TCLE_final". Neste Termo há também a descrição dos riscos de

Endereço: Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 e 2º Andar e Sala 2005 e Campus Pampulha
Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901
UF: MG Município: BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 5.224.765

quebra de sigilo dos participantes, bem como as medidas a serem adotadas para minimizar-se esses riscos. Além disso, foi removida a menção à dispensa de obtenção do TCLE que constava no item "4.1.4 Aspectos éticos" no projeto detalhado/brochura do pesquisador.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos estão adequados em sua apresentação. Nesta versão foram anexados os seguintes documentos.

-Informações básicas do projeto atualizado;

Os termos estão adequados na sua apresentação. Nessa versão foram anexados os seguintes documentos:

-Carta resposta às diligências do CEP;

-Projeto completo atualizado;

TCLE.

Recomendações:

Não há recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Somos, SMJ, favoráveis a aprovação do projeto "Título da Pesquisa: Impacto da via das quinureninas no controle de bactérias multidroga resistentes por macrófagos in vitro".

Pesquisador Responsável: CAIO TAVARES FAGUNDES.

Considerações Finais a critério do CEP:

Tendo em vista a legislação vigente (Resolução CNS 466/12), o CEP-UFMG recomenda aos Pesquisadores: comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento via emenda na Plataforma Brasil, informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa (via documental encaminhada em papel), apresentar na forma de notificação relatórios parciais do andamento do mesmo a cada 06 (seis) meses e ao término da pesquisa encaminhar a este Comitê um sumário dos resultados do projeto (relatório final).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1779075.pdf	17/01/2022 15:13:30		Aceito
Outros	CartaResposta_CEP.pdf	17/01/2022	CAIO TAVARES	Aceito

Endereço: Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 - 2º. Andar - Sala 2005 - Campus Pampulha
Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901
UF: MG Município: BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 E-mail: coep@prpq.ufmg.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS**



Continuação do Parecer: 5.224.765

Outros	CartaResposta_CEP.pdf	15:11:44	FAGUNDES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.docx	17/01/2022 15:09:49	CAIO TAVARES FAGUNDES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_final.pdf	17/12/2021 13:52:57	CAIO TAVARES FAGUNDES	Aceito
Outros	TCUD_Cinthia.pdf	25/10/2021 13:33:04	CAIO TAVARES FAGUNDES	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto_assinada.pdf	25/10/2021 13:32:01	CAIO TAVARES FAGUNDES	Aceito
Outros	Parecer_NEPE.pdf	02/08/2021 23:17:18	CAIO TAVARES FAGUNDES	Aceito
Outros	Anuencia_TI.pdf	02/08/2021 23:16:25	CAIO TAVARES FAGUNDES	Aceito
Outros	Anuencia_CCIH.pdf	02/08/2021 23:16:02	CAIO TAVARES FAGUNDES	Aceito
Outros	Anuencia_Lab.pdf	02/08/2021 23:15:41	CAIO TAVARES FAGUNDES	Aceito
Outros	UFMG_Declaracao.pdf	02/08/2021 23:11:51	CAIO TAVARES FAGUNDES	Aceito
Outros	ParecerProjetoCaio.pdf	02/08/2021 23:09:27	CAIO TAVARES FAGUNDES	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 04 de Fevereiro de 2022

Assinado por:
Crissia Carem Paiva Fontainha
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 - 2º. Andar - Sala 2005 - Campus Pampulha
Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901
UF: MG Município: BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4582 E-mail: coep@prpq.ufmg.br