

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
CURSO DE MESTRADO PROFISSIONAL EM MICROBIOLOGIA APLICADA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA - ICB**

Igor César de Oliveira Sousa

**VALIDAÇÃO DE ENSAIO MULTIPLEX POR REAÇÃO EM CADEIA DA
POLIMERASE (PCR) SEGUIDA DE HIBRIDIZAÇÃO REVERSA (*DOT BLOT*) EM
ESPÉCIMES DO TRATO RESPIRATÓRIO INFERIOR**

Belo Horizonte

2022

Igor César de Oliveira Sousa

**VALIDAÇÃO DE ENSAIO MULTIPLEX POR REAÇÃO EM CADEIA DA
POLIMERASE (PCR) SEGUIDA DE HIBRIDIZAÇÃO REVERSA (*DOT BLOT*) EM
ESPÉCIMES DO TRATO RESPIRATÓRIO INFERIOR**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Profissional em Microbiologia Aplicada do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Caio Tavares Fagundes

Co-orientadora: Dra. Ana Carolina Fialho Dias Rocha

Belo Horizonte

2022

043

Sousa, Igor César de Oliveira.

Validação de ensaio multiplex por reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida de hibridização reversa (dot blot) em espécimes do trato respiratório inferior [manuscrito] / Igor César de Oliveira Sousa. – 2022.

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

Orientador: Prof. Dr. Caio Tavares Fagundes. Co-orientadora: Dra. Ana Carolina Fialho Dias Rocha.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Mestrado Profissional em Microbiologia Aplicada.

1. Microbiologia. 2. Pneumonia /etiologia. 3. Técnicas de Laboratório Clínico. I. Fagundes, Caio Tavares. II. Rocha, Ana Carolina Fialho Dias. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO PROFISSIONAL EM MICROBIOLOGIA APLICADA

FOLHA DE APROVAÇÃO

ALUNO: IGOR CÉSAR DE OLIVEIRA SOUSA

Nº matrícula: 2019753469

Curso de Pós-graduação em Microbiologia Aplicada- NÍVEL MESTRADO

Data da defesa de dissertação: 29 de abril de 2022.

Título: "Validação de ensaio multiplex por reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida de hibridização reversa (dot blot) em espécimes do trato respiratório inferior"

A Dissertação foi submetida à apreciação da banca examinadora que emitiu parecer favorável.

Dra. Silvia Helena Sousa Pietra Pedroso

Aprovado:

Examinadora

Dr. Frederico Marianetti Soriani

Aprovado:

Examinador

Prof. Caio Tavares Fagundes

Aprovado:

Orientador

Erna Geessien Kroon

Coordenadora

Belo Horizonte, 02 de maio de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Erna Geessien Kroon, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 02/05/2022, às 09:38, 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 02/05/2022, às 10:08, 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 **Frederico Marianetti Soriani, Professor do Magistério Superior**, em 02/05/2022, às 11:42, 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 **Silvia Helena Sousa Pietra Pedroso, Usuário Externo**, em 03/05/2022, às 10:29, 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 **1421850** e o código CRC **252A8326**.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao meu **Deus** por sempre me ajudar em todos os meus sonhos e processos!

A minha **mãe** Marquicilene por nunca desistir da minha educação e sempre acreditar, mesmo eu duvidando de mim mesmo às vezes. Ao meu pai **Iraci** que sempre me ajudou!

Aos meus **amigos** por ajudarem na minha caminhada, nas palavras e correções do dia a dia em que se fizeram presente.

Ao **Dr. Cristiano, Dra. Andrea e Rômulo** por me incentivarem e acreditarem em mim.

A **Ana Carolina** por me orientar na minha formação técnica e se comportar como mãe em suas orientações e conselhos.

Ao meu **orientador**, Caio Tavares, pela paciência e dedicação em me instruir nessa jornada.

A todos os **docentes** que agregaram conhecimento na minha formação!

As **instituições** Símile medicina diagnóstica, Target medicina de precisão, Mobius Life Science e ao **hospital** Felício Rocho pela colaboração técnica.

RESUMO

A pneumonia é uma doença inflamatória aguda dos pulmões, provocada por um distúrbio infeccioso/inflamatório do parênquima pulmonar, que atinge, especialmente, os alvéolos pulmonares. No diagnóstico de pneumonia, parâmetros clínicos e valores laboratoriais são sensíveis, mas inespecíficos para etiologia da infecção. O exame microbiológico de amostras do trato respiratório inferior é estabelecido como um método confiável. Porém, as culturas geralmente precisam de 2 a 5 dias para fornecer resultados definitivos. Buscou-se neste estudo uma otimização de protocolo para diagnóstico etiológico e de genes de resistência para futura implementação na rotina de diagnóstico laboratorial de pneumonia, através da padronização e validação metodológica de um painel molecular de genes bacteriano usando amostras respiratórias. O estudo foi realizado com 53 amostras respiratórias e os resultados moleculares foram comparados com a cultura microbiológica convencional, obedecendo as recomendações dos órgãos responsáveis para validação de métodos analíticos. Os resultados das análises técnicas demonstram reprodutibilidade e repetibilidade de 100% do método. Os resultados clínicos demonstraram uma prevalência de *Streptococcus* spp (17,39%), *Pseudomonas aeruginosa* (15,65%) e *Klebsiella pneumoniae* (14,78%) com 60,86% de detecções polimicrobianas. Os principais marcadores de resistência identificados foram os genes *kpc* (25,35%) e *mecA* (16,90%). A sensibilidade clínica geral foi de 100%, com especificidade de 99,84%. O tempo de resposta das culturas microbiológicas demoraram em média 92,28 horas versus uma média de 7,1 horas na identificação genotípica. Os resultados mostraram boa concordância com a cultura convencional, excelente repetibilidade, reprodutibilidade e alta precisão analítica e clínica em detectar microrganismos e marcadores de resistência em amostras de via aérea inferior relacionados à pneumonia. Esses resultados reforçam a ideia de que, no futuro, o padrão-ouro para o diagnóstico de pneumonia poderá ser a combinação do julgamento clínico, valores laboratoriais e os resultados de painéis moleculares.

Palavras-chave: Pneumonia, identificação etiologia, validação, cultura convencional

ABSTRACT

Pneumonia is an acute inflammatory disease of the lungs, caused by an infectious/inflammatory disorder of the lung parenchyma, which affects, especially the pulmonary alveoli. Clinical parameters and laboratory values are sensitive for diagnosing pneumonia but these parameters are nonspecific for bacterial infections. Microbiological examination of samples obtained from the lower respiratory tract is well established as a reliable method. However, cultures generally take 2 to 5 days to provide definitive results. This study was designed to optimize a protocol for the diagnosis of etiological and resistance genes for future implementation in routine laboratory diagnosis of pneumonia, through standardization and methodological validation of a molecular panel of bacterial genes using respiratory samples. The study was carried out with 53 respiratory samples and the molecular results were compared with the conventional microbiological culture, following the recommendations of regulatory agencies for the validation of analytical methods. The results of the technical analysis achieved 100% reproducibility and repeatability of the method. Clinical results showed the prevalence of *Streptococcus* spp (17.39%), *Pseudomonas aeruginosa* (15.65%) and *Klebsiella pneumoniae* (14.78%) with 60.86% of polymicrobial infections. The main resistance markers identified were the KPC (25.35%) and MecA (16.90%) genes. The overall clinical sensitivity was 100%, with a specificity of 99.84%. Time for diagnosis for microbiological cultures took an average of 92.3 hours versus an average of 7.1 hours for genotypic identification. The results showed good agreement with conventional culture, excellent repeatability, reproducibility and high analytical and clinical precision in detecting microorganisms and resistance markers in pneumonia-related lower airway samples. These results reinforce the idea that, in the future, the gold standard for the diagnosis of pneumonia may be the combination of clinical judgment, laboratory values and the results of molecular panels.

Keywords: Pneumonia, identification, validation, conventional culture

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Neutrófilos e infecção pulmonar: Os neutrófilos são células efetoras da imunidade inata, que desempenham importante papel na pneumonia por meio da fagocitose de micróbios, formação das *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs), geração de diversos mediadores inflamatórios, proteases e espécies reativas de oxigênio. Fonte: MIZGERD, Joseph P., 2008 pág. 716-727.

Figura 2: Distribuição de cada sonda no Chip. Todas as sondas alvo são duplicadas no mapa e um resultado é considerado positivo se ambos os sinais forem detectados. Controles de extração, amplificação e hibridização respectivamente: Beta-Globina (BG), Controle Interno (CI) e Controle Biotina (B) Fonte: GALIANA, *et al.*, 2017; MOBIUS LIFE, 2018

Figura 3: Resultados da intensidade da reação colorimétrica imunoenzimática de cinco diferentes concentrações de DNA em amostra positiva e negativa para determinação ótima de DNA.

Figura 4: Resultados da intensidade da reação colorimétrica imunoenzimática dos alvos para determinação dos testes de repetibilidade analítica.

Figura 5: Resultados visuais das seis replicatas analisadas pelos dois analistas. PAER (*Pseudomonas aeruginosa*) KLEB (*Klebsiella pneumoniae*) KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*) VanA (Gene de resistência à vancomicina)

Figura 6: Valores da intensidade da reação colorimétrica imunoenzimática dos testes de repetibilidade e reprodutibilidade dos controle de Hibridização (B), controle de amplificação exógeno (CI), gene KPC (*kpc*), gene VanA (*VanA*), *Klebsiella pneumoniae* (KLEB) e *Pseudomonas aeruginosa* (PAER)

Figura 7: Perfis de detecção polimicrobiana no painel flow chip

Figura 8: Perfil de sensibilidade e especificidade por matriz respiratória

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição dos alvos nos Mix de PCR multiplex. Fonte: MOBIUS LIFE, 2018 Adaptado.

Tabela 2: Alvos sintéticos ou genômicos e as respectivas concentrações disponibilizados pelo fabricante .

Tabela 3: Características sociodemográficas dos pacientes.

Tabela 4: Resultados dos limites inferiores de detecção e pontos altos superiores de detecção.

Tabela 5: Resultados das repetições dos testes de determinação do limites inferiores de detecção e pontos altos superiores de detecção.

Tabela 6: Resultados da análise da microbiologia convencional

Tabela 7: Resultado microbiológico da análise do Flow chip (PCR)

Tabela 8: Resultado da análise dos marcadores de resistência no painel flow chip

Tabela 9: Avaliação da sensibilidade e especificidade clínica. NT (Não testado), Negativo verdadeiro (NV), Positivo falso (PF), Positivo verdadeiro (PV) e Negativo falso (NF)

Tabela 10: Resultado geral da análise de comparabilidade metodológica flow chip PCR versus microbiología convencional

LISTA DE ABREVIações

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AT - *Aspirado Traqueal*

BCIP - *nitro blue tetrazolium*

CDC - *Center for Disease Control and Prevention*

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa

COEP - Comitê de Ética em pesquisa

cPCR - PCR-convencional

ddPCR - Reação em cadeia da polimerase droplet digital

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DTT - *Dithiothreitol*

ESBLs - β -lactamases de espectro estendido

FISH - *Fluorescent in situ hybridization*

HS12 - *hybrisoft 12*

Kpc - *Klebsiella Pneumoniae Carbapenemase*

LBA - Lavado broncoalveolar

LOD - Limite de detecção

mini-LBA - Mini lavado broncoalveolar

MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina/ metilicina

NBT - *5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate*

ndm - New Delhi Metallo-beta-lactamase

NETs - *neutrophil extracellular Trap*

NNIS - *National Nosocomial Infection Surveillance*

oxa - Oxacillinase

PAAS - Pneumonia associada à assistência à saúde

PAC - Pneumonia adquirida na comunidade

PAH - Pneumonia adquirida em hospital

PAVM - Pneumonia associada à ventilação mecânica

PCR - Proteína C-reativa

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PCT - Procalcitonina

PBS - Fosfato Salino Tamponado

qPCR - Reação em cadeia da polimerase em tempo real

SFC - Sepsis *flow chip*

s-TREM-1 - *soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1*

SUS - Sistema Único de Saúde

TNF - Fator de necrose tumoral

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

UTI - Unidade de Terapia Intensiva

van - Vancomicina

VM - Ventilação mecânica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA _____	15
1.1 Histórico, classificação e epidemiologia das pneumonias _____	15
1.1.1 Pneumonia adquirida na comunidade (PAC) _____	15
1.1.2 Pneumonia associada à assistência à saúde (PAAS) _____	17
1.1.3 Pneumonia adquirida em hospital, hospitalar ou nosocomial (PAH) _____	17
1.1.4 Pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) _____	18
1.2 Patogênese _____	19
1.3 Microrganismos associados à pneumonia é mecanismos de resistência a antimicrobianos _____	21
1.3.1 Microrganismos associados à pneumonia _____	21
1.3.2 Tratamento e mecanismos de resistência a antimicrobianos _	23
1.3.2.1 Resistência a β -lactâmico _____	25
1.3.2.2 Resistência aos glicopeptídeos _____	26
1.4 Diagnóstico pneumonia _____	27
1.4.1 Clínico e Radiológico _____	27
1.4.2 Laboratorial e Marcadores biológicos de infecções _____	28
1.4.3 Microbiológicos _____	29
1.4.4 Moleculares _____	30
2 JUSTIFICATIVA _____	33
3 OBJETIVOS _____	34
3.1 Objetivo geral _____	34
3.2 Objetivos específicos _____	34
4 MATERIAL E MÉTODOS _____	35
4.1 Obtenção dos espécimes clínicos e laudos laboratoriais _____	35
4.2 Aspectos éticos _____	35
4.3 Coleta de amostras clínicas _____	36
4.4 Extração e quantificação de DNA genômico _____	37
4.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR) e Hibridização Reversa (Dot Blot) _____	38

4.6 Validação e avaliação de desempenho analítico _____	41
4.6.1 Testes para determinação do limite inferior de detecção e pontos altos superiores de detecção _____	41
4.6.2 Testes para determinação ótima da concentração de DNA _____	43
4.6.3 Testes para determinação da repetibilidade analítica _____	43
4.7 Validação e avaliação de desempenho clínico _____	44
4.7.1 Testes de precisão e exatidão clínica _____	44
4.7.1.1 Repetibilidade _____	43
4.7.1.2 Precisão intermediária _____	44
4.7.1.3 Teste de sensibilidade e especificidade clínica _____	45
4.8 Normas e Análises estatísticas _____	45
5. RESULTADOS _____	47
5.1 Características gerais dos pacientes _____	47
5.2 Análise dos resultados analíticos _____	48
5.2.1 Resultados dos limites inferiores de detecção e pontos altos superiores de detecção _____	48
5.2.2 Resultados da determinação ótima da quantidade de DNA _____	56
5.2.3 Resultados dos testes de repetibilidade analítico _____	57
5.2.4 Análise do teste de precisão (repetibilidade e reprodutibilidade) _____	58
5.3 Análise dos resultados clínicos _____	61
5.3.1 Análise do resultado microbiológico _____	61
5.4 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos na microbiologia convencional _____	62
5.5 Análise do resultado do painel flow chip _____	63
5.6 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos no painel flow chip _____	64
5.7 Análise do teste sensibilidade e especificidade clínica _____	65
6. DISCUSSÃO _____	75
7. CONCLUSÃO _____	81
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	83

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 HISTÓRICO, CLASSIFICAÇÃO E EPIDEMIOLOGIA DAS PNEUMONIAS

Pneumonia é uma palavra de origem grega derivada de “*pneumon*”, que significa pulmão, e acrescida do sufixo “*ia*”, usado para caracterizar “doença”, “pneumonia” se torna, em definição, “doença pulmonar” (SATTAR e SHARMA, 2020). A pneumonia é uma doença aguda dos pulmões, provocando um distúrbio infeccioso/inflamatório do parênquima pulmonar, que atinge, especialmente, os alvéolos pulmonares, pequenas bolsas de ar onde ocorre a hematose. Na maioria das vezes tem casuística infecciosa, sendo causada principalmente por bactérias e vírus, e de forma menos frequente, por fungos e parasitas (SBIM, 2016; BLASI *et al.*, 2007). Ela é uma das principais doenças letais em todo mundo e é um dos problemas médicos mais comuns na prática clínica (ASSUNÇÃO, 2018). Esta infecção influencia drasticamente no tempo de hospitalização/internação e nos índices de morbidade e mortalidade, elevando de maneira significativa os custos, principalmente quando se leva em consideração o uso de antimicrobianos, gastos com isolamento e exames laboratoriais (ANDRADE *et al.*, 2006; BERALDO, 2008).

De acordo com o local de origem onde é adquirida, há quatro classificações relacionadas à pneumonia: pneumonia adquirida na comunidade (PAC), pneumonia adquirida em ambiente hospitalar ou nosocomial (PAH), pneumonia associada à assistência à saúde (PAAS) e pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) (SATTAR e SHARMA, 2021; ANAND, 2009).

1.1.1 Pneumonia adquirida na comunidade (PAC)

A pneumonia adquirida na comunidade é aquela contraída no âmbito social, externo ao ambiente hospitalar, ou que apresente manifestação em até 2 dias após internação. Caracteriza-se por se manter como uma doença infecciosa aguda de alto impacto financeiro, advindo do tratamento, custo médico e social, além da consequente morbidade. Os grupos etários de maior ocorrência de complicações graves são crianças e idosos, justificando as medidas preventivas dirigidas a estas faixas populacionais, tais como campanhas de incentivo à vacinação que estão recomendadas no calendário nacional de vacinação proposto pelo Ministério da

Saúde (CORRÊA *et al.*, 2018). Apesar do desenvolvimento dos métodos de diagnóstico, melhora do conhecimento da fisiopatologia, aprimoramento dos métodos propedêuticos e terapêuticos, alguns pontos ainda devem ser investigados. Isto se deve ao fato de que alguns parâmetros não podem ser previstos em um todo, tais como diversidade clínica, social, demográfica e estrutural de cada caso (CORRÊA *et al.*, 2009; MUSHER *et al.*, 2014; LOKE *et al.*, 2010; MUSHER *et al.*, 2013). Contudo, de acordo com as “Recomendações para o manejo da pneumonia adquirida na comunidade” (2018), as avaliações por base de escores desenvolvidos e disponíveis, a exemplo do CURB-65, podem dimensionar a gravidade e ajudam a prever o prognóstico da PAC, guiando a decisão quanto ao local de tratamento (ambulatorial, hospitalar ou UTI), quanto à necessidade de investigação etiológica e quanto à escolha do antimicrobiano e sua via de administração. Entretanto, outros fatores devem ser levados em consideração, como disponibilidade de medicação por via oral, comorbidades prévias, fatores psíquicos e sociais e condições econômicas que podem vulnerabilizar o paciente (PRINA *et al.*, 2017; MANDELL *et al.*, 2007; CORRÊA *et al.*, 2017).

Embora, em alguns casos, possa haver resposta inadequada a alguns tratamentos, recomendações para manejo de pneumonias comunitárias não grave, com tratamento ambulatorial, não incluem a realização de testes de determinação etiológica, salvo em casos graves ou aqueles que não respondem a terapia empírica inicial (CORRÊA *et al.*, 2018). Controversamente, análises epidemiológicas relacionadas a PAC demonstram em estudos conduzidos por BAHLLIS *et al.* (2018) que esta enfermidade é uma das principais causadoras de mortes por doenças infecciosas em todo o mundo, com taxas de mortalidade variando de 1%, em pacientes ambulatoriais, até 50%, em pacientes hospitalizados, de acordo com a população e o contexto estudado, principalmente em países em desenvolvimento, como Brasil, Argentina e Índia.

No Brasil, dados provenientes do Sistema Único de Saúde revelaram que a PAC foi a segunda causa de hospitalização em 2017, sendo responsável por aproximadamente 14% de todas as hospitalizações (BRASIL, 2021). Embora seja notificada uma alta incidência no país, pouco ainda se sabe, devido à escassez de estudos, sobre os perfis epidemiológicos locais e regionais, assim como a gravidade desta patologia no Brasil (DONALISIO *et al.*, 2011). Alguns estudos realizados por

BRITO *et al.* (2016), BAHLIS *et al.* (2018) e MANDELL *et al.* (2007) em um cenário brasileiro demonstraram que os principais agentes etiológicos responsáveis por esta enfermidade são *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* e agentes atípicos como *Chlamydia pneumoniae* e *Mycoplasma pneumoniae*.

1.1.2 Pneumonia associada à assistência à saúde (PAAS)

Apesar da existência desta classificação, a definição de pneumonia associada à assistência à saúde é problemática e controversa, visto que alguns autores incluem a pneumonia nosocomial e aquelas associadas à ventilação mecânica dentro desta categoria (SATTAR e SHARMA, 2021). Contudo, a definição estabelecida pelas diretrizes sobre pneumonia associada à ventilação mecânica (2007), estabelece que a pneumonia associada ou relacionada aos cuidados de saúde acomete pacientes residentes em asilos ou tratados em sistema de internação domiciliar, pacientes que receberam antimicrobianos por via endovenosa ou quimioterapia, nos 30 dias precedentes à infecção, pacientes em terapia renal substitutiva, e aqueles que foram hospitalizados em caráter de urgência por dois ou mais dias, nos últimos 90 dias antes da atual infecção.

1.1.3 Pneumonia adquirida em hospital, hospitalar ou nosocomial (PAH)

A pneumonia hospitalar (PAH) ou nosocomial é aquela que ocorre em pacientes submetidos à assistência, procedimentos médicos ou institucionais (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 2005). Ela ocorre após 48 horas de admissão hospitalar, não estando relacionada à intubação endotraqueal e/ou ventilação mecânica, sendo geralmente tratada na unidade de internação ou unidade de terapia intensiva, quando se apresenta ou evolui para as formas graves da doença (DIRETRIZES SOBRE PNEUMONIA ASSOCIADA À VENTILAÇÃO MECÂNICA, 2007). Constituem-se uma importante causa de morbimortalidade, apesar de avanços obtidos nos métodos diagnósticos e recursos terapêuticos nos últimos anos (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 2005; SOUZA *et al.*, 2020).

Devido às implicações etiológicas, terapêuticas e prognósticas, a PAH é subclassificada quanto ao tempo decorrido desde a admissão até o seu

aparecimento: precoce, quando ocorre até o quarto dia de internação, ou tardia, quando se inicia após quinto dia da hospitalização (DIRETRIZES SOBRE PNEUMONIA ASSOCIADA À VENTILAÇÃO MECÂNICA, 2007).

Os principais microrganismos envolvidos nessa infecção são os Gram-negativos como *Acinetobacter spp*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp* e *Proteus mirabilis*, além do Gram-positivo *Staphylococcus aureus*, que invadem as vias aéreas inferiores, sendo originada pela inalação de aerossóis ou por disseminação hematogênica proveniente de focos distais, em grande parte advinda da cavidade bucal (ALOTAIBI *et al.*, 2014; SOUZA *et al.*, 2020; MORAIS *et al.*, 2006).

1.1.4 Pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV)

A pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) é definida como a pneumonia que ocorre em pacientes após 48 horas de intubação endotraqueal e o início da ventilação mecânica invasiva ou até 48 horas após a extubação. A presença dos tubos traqueais, responsáveis pela ventilação, submete o paciente a diversos microrganismos, dentre eles, os possivelmente patogênicos, pois reduz o mecanismo de defesa natural das vias aéreas superiores e do pulmão, como a filtração aerodinâmica, depuração mucociliar e reflexos da tosse, permitindo assim o acesso ao trato respiratório inferior pelo microrganismo (BRABO e ZEITOUN, 2017).

De acordo com o tempo de manifestação, a PAV pode ser subclassificada em precoce, quando manifesta-se até 96 horas de intubação, ou tardia, quando se manifesta após este período (VIEIRA, 2014; KOENIG e TRUWIT, 2006). Com maior frequência, a PAV precoce é causada por microrganismos sensíveis aos antimicrobianos e provavelmente provenientes da cavidade orofaríngea. PAV tardia geralmente é causada por bacilos gram negativos, principalmente os multirresistentes, com reduzidas opções terapêuticas. (VIEIRA, 2014; AMERICAN THORACIC SOCIETY, 2005; AMERICAN THORACIC SOCIETY, 2016). Em geral, os principais microrganismos relacionados a PAV são *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (MATHAI *et al.*, 2015; MOREIRA e GONTIJO FILHO, 2012; SOUZA *et al.*, 2021).

De acordo com as DIRETRIZES SOBRE PNEUMONIA ASSOCIADA À VENTILAÇÃO MECÂNICA (PAV) (2006), há uma ausência de dados nacionais e multicêntricos no Brasil. Experiências individuais mostram as PAV como as mais frequentes infecções dentro da UTI. Um estudo feito pela *National Nosocomial Infection Surveillance* (NNIS) do *Center for Disease Control and Prevention* (CDC), dos Estados Unidos da América, mostrou que a taxa de pneumonia em pacientes em uso da ventilação mecânica chega a ser até 21 vezes maior que em pacientes que não fazem uso desse suporte. Bezerra *et al.* (2012) concluiu que até 20% daqueles que utilizam a ventilação mecânica por mais de 48 horas desenvolveram a doença. Apesar da falta de estudos, o Brasil é protagonista na lista dos países com maior número de casos (NUNES *et al.*, 2017).

1.2 PATOGÊNESE

A pneumonia é uma doença inflamatória dos pulmões, resultante de uma infecção complexa, onde o trato respiratório inferior sofre a invasão de um agente patogênico. O início da pneumonia se dá através da aspiração ou inalação de microrganismos patogênicos. Para o desenvolvimento da pneumonia, há a necessidade de que os microrganismos patogênicos cheguem ao trato respiratório inferior e sejam eficientes em escapar dos mecanismos de defesa do sistema respiratório, que incluem os mecanismos mecânicos (reflexo glótico, tosse e sistema de transporte mucociliar), humorais (surfactantes, anticorpos e fatores do sistema complemento), e celulares (leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e linfócitos) (ASSUNÇÃO *et al.*, 2018; CELLIS *et al.*, 1988; AMERICAN THORACIC SOCIETY, 2005). Adentrando aos pulmões, estes microrganismos colonizam e invadem a região. Alguns elementos estruturais das bactérias, como flagelos, fímbrias e polissacarídeos capsulares, tornam o processo de adesão mais ágil e eficaz (AYKAC *et al.*, 2017). Na infecção pulmonar, os neutrófilos migram para fora dos capilares pulmonares e para os espaços alveolares (BURNS *et al.*, 2003). Após a fagocitose, os neutrófilos eliminam os microrganismos ingeridos com espécies reativas de oxigênio, proteínas antimicrobianas e enzimas degradativas. Outra via microbicida também é acionada, a *neutrophil extracellular Trap* (NET). Neutrófilos liberam NETs, composto por uma rede de cromatina contendo proteínas antimicrobianas que

capturam e destroem os microrganismos (Figura 1) (NATHAN, 2006; BRINKAMANN, 2004 *apud* MIZGERD, 2009).

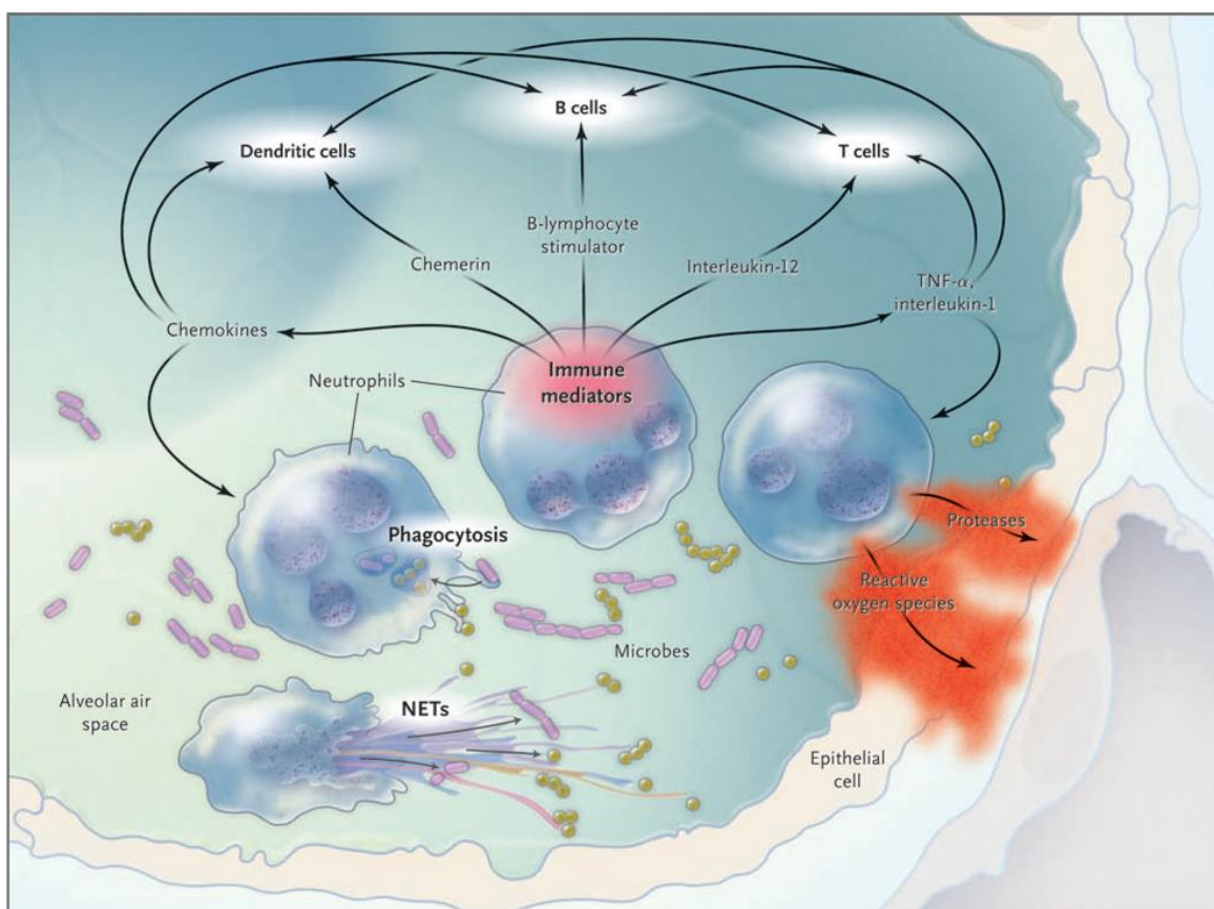


Figura 1: Neutrófilos e infecção pulmonar: Os neutrófilos são células efetoras da imunidade inata, que atuam por meio da fagocitose de micróbios, formação das *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs), geração de diversos mediadores inflamatórios, proteases e espécies reativas de oxigênio. Fonte: MIZGERD, Joseph P., 2008 pág. 716-727.

O conteúdo de proteínas plasmáticas no interstício e nos espaços aéreos dos pulmões infectados dependem de ações combinadas do fluxo pericelular e do transporte transcelular pelo endotélio e células epiteliais. Estas proteínas, incluindo anticorpos naturais, proteínas do sistema complemento e proteína C reativa, são importantes para defesa contra os microrganismos nos pulmões. Elas atuam como opsoninas, exercendo atividades bacteriostáticas e microbicidas durante a infecção (KOPF *et al.*, 2002 *apud* MIZGERD, 2009).

Este processo leva a um quadro de inflamação do parênquima pulmonar, região importante para as trocas gasosas, processo de competência do sistema respiratório. Logo, os bronquíolos e alvéolos são preenchidos por exsudato

inflamatório, dificultando a hematose e levando ao quadro clássico de insuficiência respiratória (MACHADO *et al.*, 2017; ASSUNÇÃO *et al.*, 2018).

Outro processo que merece destaque em pacientes com pneumonia associada à ventilação mecânica é a formação de biofilme por via intraluminal, atuando como reservatório de microrganismos, que por sua vez podem ser deslocados com a passagem do cateter de aspiração (CLHEBICKI, 2007). No biofilme, os microrganismos estão mais resistentes à ação de agentes químicos, muitas vezes sendo removidos apenas com ação mecânica (DONLAN, 2002).

1.3 MICRORGANISMOS ASSOCIADOS À PNEUMONIA E MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

1.3.1 Microrganismos associados à pneumonia

Preferencialmente, os microrganismos causadores do quadro infeccioso são da microbiota indígena e/ou de indivíduos de convívio. Quando de fontes externas, advém de mãos dos profissionais de saúde, transferência de patógenos entre pacientes e/ou materiais e equipamentos hospitalares não estéreis e seus elementos associados, como ar, água, sondas, tubos e fômites. (ALBERNAZ *et al.*, 2015; ASSUNÇÃO *et al.*, 2018). A colonização bacteriana patogênica no trato respiratório é desenvolvida principalmente por bactérias, como *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*, comumente isoladas em Unidades de Terapia Intensiva (UTI). Além destas, outras bactérias também são relacionadas à infecção em ambiente hospitalar via método de respiração mecânica. São normalmente microrganismos com baixa exigência nutricional, com larga expressão de fatores de virulência, aeróbios e não esporulados como bactérias da família *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, *Proteus spp.*, *Serratia marcescens* e *Stenotrophomonas maltophilia* (ASSUNÇÃO *et al.*, 2018; RELLO *et al.*, 2002; VALLES *et al.*, 2003)

Streptococcus pneumoniae (ou pneumococo) é uma das principais bactérias que causam otite média, pneumonia adquirida na comunidade e meningite. O sucesso do pneumococo decorre de sua capacidade de persistir na população como comensal e evitar a morte pelo sistema imunológico (LOUGHRAN *et al.*, 2018)

Staphylococcus aureus apresenta uma grande importância em infecções humanas de tecidos moles e corrente sanguínea, além de ter grande impacto causando pneumonia em crianças e adultos. Há uma crescente incidência de pneumonia grave sendo relatada em indivíduos saudáveis, principalmente quando causada por cepas de *S. aureus* resistente à meticilina/oxacilina (MRSA). Quando ligada à pneumonia associada à ventilação mecânica, *S. aureus* tem grande impacto na morbimortalidade e se destaca por ser um dos microrganismos mais comumente associados a este tipo de pneumonia (WARDENBURG e SCHNEEWIND, 2008).

Pseudomonas aeruginosa se destaca por ser um agente infeccioso frequentemente isolado em ambientes hospitalares (PIRES *et al.*, 2009). Pode infectar qualquer sítio anatômico em organismo suscetível, frequentemente, infecções do trato respiratório. Infecções causadas por *P. aeruginosa* são mais frequentes em pacientes internados em UTI, devido à sensibilidade dos pacientes internados. Além disso, é encontrada em pacientes imunocomprometidos, em internação prolongada e traqueostomizados, frequentemente apresentando resistência aos antimicrobianos, frustrando a conduta terapêutica moderna (MACEDO *et al.*, 2005, SADER *et al.*, 2001; GUIMARÃES *et al.*, 2006; PIRES *et al.*, 2009)

Acinetobacter baumannii é um dos patógenos que estão se tornando um dos principais causadores de infecções hospitalares, incluindo pneumonia hospitalar e pneumonia associada à ventilação mecânica. Devido à expressão de resistência aos antimicrobianos por este microrganismo, atualmente essa espécie representa um desafio no tratamento das pneumonias, fazendo com que médicos busquem outras opções terapêuticas, como as polimixinas (colistinas) para o tratamento, que possuem toxicidade alta para o organismo do hospedeiro (HARTZELL *et al.*, 2007).

A *Klebsiella pneumoniae*, é reconhecida como um dos patógenos primários ligado à pneumonia e choque séptico em pacientes de histórico etilista crônico, e com alta taxa de mortalidade para aqueles que não são tratados corretamente. As infecções por essa bactéria podem ser também oportunistas, causando sérias complicações clínicas em pacientes hospitalizados, que apresentem alguma doença de base, ou imunossupressão (KONEMAN *et al.*, 2001). Nesse último caso, esta bactéria é capaz de encontrar ambiente propício para o seu crescimento, podendo levar a quadros graves de infecção (DESIMONI *et al.*, 2004). Um fator de alta

importância clínica presente em cepas de *K. pneumoniae* é a produção de Klebsiella Pneumoniae Carbapenemase (kpc), uma enzima que confere resistência aos antimicrobianos carbapenêmicos e, além disso, é capaz de inativar grupos de antimicrobianos que apresentam anel beta-lactâmico em sua estrutura (CUNHA., 2014).

Outros microrganismos que merecem destaque são: *Stenotrophomonas maltophilia* e a *Serratia marcescens*. A primeira, em ambiente hospitalar, tem capacidade de aderir às superfícies plásticas como cânulas intravenosas, facilitando a colonização e infecção. Geralmente esta bactéria é oportunista e de baixa virulência, afetando principalmente pacientes imunocomprometidos ou em coinfeções com outras bactérias. A dificuldade relacionada à *S. maltophilia* está na seleção de microrganismos multidroga resistente aos antimicrobianos clássicos, incluindo beta-lactâmicos, quinolonas e aminoglicosídeos. Sua resistência é adquirida através de transferência gênica horizontal e mutações (BERG *et al.*, 2018). A segunda, é uma bactéria oportunista, associada a infecções nosocomiais, principalmente aquelas relacionadas a corrente sanguínea e do trato respiratório (MENEZES, 2004). Apresenta uma resistência intrínseca a antimicrobianos, e é persistente por longos períodos no ambiente hospitalar (TAVARES, 2015).

1.3.2 Tratamento e mecanismos de resistência a antimicrobianos

A terapêutica direcionada para o tratamento de pneumonia, principalmente quando se fala de origem hospitalar ou daquela associada à ventilação mecânica, será baseada na presença de fatores de riscos para infecções com microrganismos multirresistentes. Inicialmente poderá ser utilizado antibioticoterapia de amplo espectro, ajustando com descalonamento, de acordo com os dados microbiológicos, clínicos e de imagem, bem como evolução clínica do paciente (CHAHOUUD *et al.*, 2015). Desta forma, tomada a decisão de se iniciar o uso da antibioticoterapia, é fundamental a escolha adequada, conhecimento da prevalência dos patógenos e os respectivos perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos na unidade em que o paciente está internado. Este entendimento é de suma importância, uma vez que dentro do mesmo hospital os esquemas empíricos para tratamento da PAH/PAV podem ser diferentes (DIRETRIZES BRASILEIRAS PARA TRATAMENTO DE

PNEUMONIAS ADQUIRIDAS NO HOSPITAL E DAS ASSOCIADAS À VENTILAÇÃO MECÂNICA, 2007).

O tratamento em média dura uma semana, dependendo da gravidade clínica e dos dados microbiológicos disponíveis (PHILLIPS *et al.*, 2015). Uso prolongados de antimicrobianos de amplo espectro utilizados no tratamento dessas infecções tem contribuído para aumentar os índices de mortalidade, lesão renal e aumento da taxa de seleção de microrganismos multirresistentes (CHAHOUH *et al.*, 2015).

Dentre os principais antimicrobianos utilizados na clínica atualmente, destaca-se os β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos, oxapeninas e monobactamas) que corresponderam a 50% do total de vendas de antibióticos em 2004 (VON *et al.*, 2006). Estes agentes antibacterianos inibem irreversivelmente a enzima transpeptidase, um catalisador da reação de transpeptidação entre as cadeias de peptidoglicana da parede celular bacteriana, levando a formação de ligações cruzadas, ou cross-linking, entre as cadeias peptídicas da estrutura de peptidoglicana, que conferem à parede celular uma estrutura rígida, importante para proteção da célula bacteriana contra variação osmótica do meio (SUÁREZ *et al.*, 2008; GUIMARÃES *et al.*, 2010).

Hoje, várias décadas após a descoberta da penicilina, esta classe de antimicrobianos, ainda é a mais utilizada. É a primeira classe derivada de produtos naturais utilizados no tratamento terapêutico de infecções bacterianas. Possuem amplo espectro de atividade antibacteriana, eficácia clínica e excelente perfil de segurança, uma vez que atuam na enzima transpeptidase, única em bactérias (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

Em sua composição os antibióticos β -lactâmicos têm um elemento estrutural farmacofórico em comum, o anel azeitinona de quatro membros, ou anel β -lactâmico. Em sua maioria, o anel central β -lactâmico é fundido a outro anel de cinco (tiazolidínico), formando as penicilinas, ou seis (di-hidrotiazínico) membros, formando as cefalosporinas (SUÁREZ *et al.*, 2008). Aliado a isso, o sistema bicíclico, apresenta papel fundamental para a atividade do antibiótico, mimetizando o resíduo dipeptídeo terminal D-Ala-D-Ala da cadeia de peptidoglicana, substrato da enzima transpeptidase (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

A avaliação dos tratamentos para o combate às infecções devido aos microrganismos que produzem β -lactamases, principalmente β -lactamases de

espectro estendido (ESBL) é complicada pela diversidade dessas enzimas e pela variedade de fatores que podem modificar sua expressão. Os resultados podem ser influenciados pelo tipo de infecção e dependendo se o paciente está efetivamente infectado ou apenas colonizado. Frequentemente os pacientes estão infectados com vários patógenos necessitando de múltiplos agentes antimicrobianos. Também, é importante mencionar que trocas significativas de uso de antimicrobianos também exercem uma pressão seletiva para novos microrganismos resistentes (NAKANO *et al.*, 2014).

A terapia antimicrobiana para infecções causadas por *Staphylococcus aureus*, inicialmente eram simples. Penicilinas funcionaram bem até a década de 1960, quando começaram a surgir isolados resistentes a esses antimicrobianos. Buscando contornar esta dificuldade clínica, foi criado o beta-lactâmico sintético meticilina, que era resistente à ação das beta-lactamases que o *S. aureus* produz. Contudo, após o advento da meticilina, surgiram relatos de cepas resistentes também a esse antimicrobiano, além de expressões de multirresistência. Essas cepas foram denominadas de MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina) e são resistentes a todos os antimicrobianos beta-lactâmicos (LOWY, 1999; GELATTI, *et al.*, 2009). Alternativamente, a partir da década de 60 e 70, com o surgimento dos MRSA, a vancomicina passou a ser reutilizada para estes casos, pois esses microrganismos seriam sensíveis a este medicamento. A partir dessa data, houve um aumento do consumo de vancomicina, principalmente devido aos surtos de infecção hospitalar ocasionados por MRSA, primeiramente com ocorrência maior nos Estados Unidos da América e, após algum tempo, em vários outros países (MARINHO *et al.*, 2005).

1.3.2.1 Resistência a β -lactâmicos:

Na resistência associada aos antimicrobianos β -lactâmicos, o principal mecanismo envolve a produção de enzimas hidrolíticas, chamadas β -lactamases, que apresentam grupos nucleofílicos (em geral, resíduos de serina) com capacidade de promover a hidrólise, pela quebra da ligação amida do anel β -lactâmico, levando à formação de produtos inativos, que perdem, assim, a capacidade de inibir a síntese da parede celular bacteriana (SUÁREZ *et al.*, 2009; WILLIAMS, 1999). Este

mecanismo envolve a aquisição e/ou alteração de genes codificadores das enzimas, tais como, TEM, SHV, CTX-M, OXA, PER, GES, VEB, BES, TLA e KPC e são encontrados principalmente em *Escherichia coli* e *Klebsiella* sp., mas também podem ser detectadas em *Proteus mirabilis*, *Enterobacter* sp., e outras espécies de Enterobacteriaceae, além de *Acinetobacter* sp. e *Pseudomonas* sp., (CANTÓN *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2014).

O mecanismo de resistência à meticilina, principalmente relacionado ao *Staphylococcus aureus* está relacionado ao desenvolvimento de uma PBP (proteínas ligadoras de penicilina) adicional, a PBP2a, que é plenamente funcional, mas não tem afinidade por antimicrobianos beta-lactâmicos. A codificação dessas novas PBPs, tornando esses patógenos resistentes à oxacilina, está relacionada à aquisição do gene *mecA*, o qual faz parte de um elemento genético móvel detectado em isolados de MRSA. Esse gene é parte integrante de um elemento genômico denominado "cassete cromossômico estafilocócico mec" (SCC*mec*) (CHAMBERS, 1997; GELATTI, *et al.*, 2009).

1.3.2.2 Resistência aos glicopeptídeos

Mecanismos de resistência aos antimicrobianos devido a troca de plasmídeos ou por mutações cromossômicas conferem ao gênero *Enterococcus* uma suscetibilidade diminuída a vários antibióticos glicopeptídeos, como a vancomicina. Desta forma, esta resistência pode ser compartilhada entre isolados do mesmo gênero ou até mesmo entre outros gêneros bacterianos, como *Staphylococcus* sp. ou *S. aureus* (FIGUEREDO *et al.*, 2017; HENKES, 2010; MOURA *et al.*, 2006).

O mecanismo de resistência a vancomicina desenvolvido por bactérias é caracterizado pela reprogramação e modificação da estrutura alvo na célula bacteriana. Sendo assim, os sítios de ação do antimicrobiano, como ribossomos, proteínas e constituintes da parede celular, são estruturalmente alterados de acordo com genes que expressam, conseqüentemente diminuindo ou inibindo a capacidade de ação do fármaco no seu sítio de ligação (SILVEIRA *et al.*, 2006). Na alteração do sítio de ação do antimicrobiano, quando relacionado a modificação de precursores de peptidoglicano na parede celular bacteriana, ocorre por substituição do dipeptídeo terminal D-Ala-D-Ala. Esse mecanismo pode ocorrer de duas formas,

troca do aminoácido terminal D-Alanina para D-Lactato (conferindo uma resistência de alto nível) ou D-Alanina para D-Serina (conferindo uma resistência de baixo nível) (FIGUEREDO *et al.*, 2017; SILVEIRA *et al.*, 2006).

De acordo com bases fenotípicas e genotípicas, a resistência de *Enterococcus* é caracterizada em oito tipos, sendo que *vanA*, *vanB* e *vanC* são os mais frequentes. Cepas com resistência à vancomicina e a teicoplanina são classificadas no fenótipo VanA, enquanto que resistência somente à vancomicina, e sensíveis a teicoplanina no VanB. Os genótipos *vanA* e *vanB* possuem uma maior importância clínica, pois são capazes de realizar uma transferência conjugativa para *S. aureus*, e estão frequentemente associados com cepas de *E. faecium* e *E. faecalis* (FIGUEREDO *et al.*, 2017; SILVEIRA *et al.*, 2006; MOURA *et al.*, 2006).

1.4 DIAGNÓSTICO DE PNEUMONIA

1.4.1 Clínico e Radiológico

A primeira etapa do diagnóstico consiste em avaliar se a síndrome infecciosa apresentada pelo paciente é compatível com pneumonia ou se há alternativas a este diagnóstico. Isto implica criteriosa avaliação dos sinais, pesquisa de fatores e condições de risco para agentes etiológicos específicos, indispensáveis à definição de caso, e estabelecimento da gravidade do mesmo (DIRETRIZES SOBRE PNEUMONIA ASSOCIADA À VENTILAÇÃO MECÂNICA, 2007). Sinais clínicos como febre $>38^{\circ}\text{C}$, presença de secreções purulentas ou mudança de características (cor, odor, consistência) ou aumento da secreção, piora da troca gasosa, ausculta com roncocal e/ou estertores, além de piora da tosse ou dispneia ou taquipneia são critérios clínicos preconizados pela ANVISA para o diagnóstico (MENDONÇA *et al.*, 2019).

O exame radiológico do tórax revela presença de infiltrado persistente de caráter recente ou progressivo, cavitação pulmonar ou consolidação (ASSUNÇÃO *et al.*, 2018). Embora tenha papel fundamental no diagnóstico, tem baixo valor preditivo positivo, uma vez que as alterações encontradas não se correlacionam bem com os achados histopatológicos e com os agentes etiológicos. De fato, há grande discordância de interpretações de alterações radiológicas entre observadores, e mesmo entre especialistas, em relação ao diagnóstico clínico presuntivo, como

também em relação à predição da etiologia. São comuns outras doenças concomitantes, proporcionando infiltrados e consolidações pulmonares, podendo se citar o derrame pleural, edema pulmonar, infarto pulmonar, hemorragia alveolar, atelectasias, síndrome do desconforto respiratório agudo, e tumores, assim como outras possíveis explicações. Além disto, a radiografia de tórax realizada no leito apresenta limitações que podem comprometer a sua interpretação (DIRETRIZES SOBRE PNEUMONIA ASSOCIADA À VENTILAÇÃO MECÂNICA, 2007).

1.4.2 Laboratorial e Marcadores biológicos de infecções

Exames bioquímicos de rotina, tais como glicemia e dosagem de eletrólitos, marcadores da função renal e hepática e gasometria arterial não são de valor na identificação do patógeno, todavia devem ser realizados para auxiliar na avaliação da disfunção do organismo, implicando na definição do prognóstico (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 2005). Em casos de derrame pleural significativo, para fins de diagnóstico, a toracocentese deve ser realizada. O líquido pleural deve ser enviado para exames laboratoriais e microbiológicos. Pacientes em ventilação mecânica devem ter atenção especial devido ao risco de pneumotórax associado ao procedimento (DIRETRIZES BRASILEIRAS PARA TRATAMENTO DE PNEUMONIAS ADQUIRIDAS NO HOSPITAL E DAS ASSOCIADAS À VENTILAÇÃO MECÂNICA, 2007).

Alguns marcadores biológicos têm sido utilizados para investigar infecções, devido às limitações microbiológicas na confirmação diagnóstica de pneumonia, como a procalcitonina (PCT), um peptídeo com 116 aminoácidos, análogo ao hormônio calcitonina, porém sem atividade hormonal. Em indivíduos saudáveis, os níveis séricos deste peptídeo são extremamente baixos ou indetectáveis; em infecções bacterianas graves e sepse, os níveis séricos deste peptídeo estão elevados, fato não observado em infecções não bacterianas. Níveis elevados de PCT em pacientes com PAV são mais frequentemente observados do que em comparação com aqueles que não apresentam pneumonia, sendo superiores em pacientes que vem a óbito (ASSICOT *et al*, 1993; DIRETRIZES BRASILEIRAS PARA TRATAMENTO DE PNEUMONIAS ADQUIRIDAS NO HOSPITAL E DAS ASSOCIADAS À VENTILAÇÃO MECÂNICA, 2007). O *Soluble Triggering Receptor*

Expressed on Myeloid cells-1 (s-TREM-1, receptor solúvel de ativação expresso em células mielóides) é um membro da família das imunoglobulinas expresso em células fagocitárias como macrófagos e neutrófilos, que apresenta níveis elevados na presença de produtos microbianos. Um estudo realizado por GILBOT *et al.*, 2004 demonstrou que, em pacientes portadores de PAV, o achado do sTREM-1 no lavado broncoalveolar foi mais preciso no diagnóstico do que qualquer critério clínico, com sensibilidade de 98% e especificidade de 90%. Outro marcador, a proteína C-reativa (PCR), é uma proteína da família pentraxinas. Ela vem demonstrando ser útil na identificação de pacientes com pneumonia que apresentam evolução desfavorável, mantendo-se alta após quatro dias de início do tratamento com antimicrobianos (POVOA, *et al.*, 2005). Em adultos saudáveis a concentração da PCR é extremamente baixa, menor que 1,0 mg/dL. Na infecção a secreção da PCR inicia-se 4-6 horas após o estímulo inflamatório, dobrando a cada 8 horas e com pico sérico após 36-50 horas. Após a suspensão do estímulo seus níveis diminuem rapidamente. A dosagem sérica da PCR tem sido usada como ferramenta no diagnóstico da infecção, na conduta da terapia antimicrobiana, além de seu papel no prognóstico e seguimento do tratamento (MORENO,2011).

1.4.3 Microbiológicos

O cultivo clássico de patógenos ainda é amplamente utilizado, porém o seu resultado requer algumas avaliações, pois critérios, tais como sítio de origem do material cultivado, podem apresentar divergências. Por exemplo, cultivos de amostras das vias aéreas superiores não refletem de maneira satisfatória a proliferação do foco infeccioso pneumônico nas vias inferiores. Esta falta de relação é muito comum em bactérias das espécies *S. pneumoniae* ou *Haemophilus influenzae* (RODRIGUES *et al.*, 2002). Contudo, a recuperação de patógenos das vias aéreas inferiores não é suficiente para o diagnóstico. O líquido recolhido pelo lavado broncoalveolar, mediante a infusão de soro fisiológico pelo fibrobroncoscópico no segmento pulmonar suspeito, identificado pela análise radiológica, deverá ser encaminhado para cultura quantitativa. Um ponto de corte de 10^4 unidades formadoras de colônias (UFC/mL) é usado para diferenciação entre colonização e infecção. Um estudo realizado por BALTHAZAR *et al.*, 2001 no Brasil mostrou

sensibilidade de 92,5% e especificidade de 94,1%, utilizando-se o Lavado broncoalveolar com cultura quantitativa para diagnóstico da PAV.

Porém, algumas dificuldades são encontradas nos métodos fibrobroncoscópicos. Por exemplo, em pacientes graves, um volume recomendado do lavado broncoalveolar é de difícil obtenção. A análise rápida dos microrganismos intracelulares pelo Gram necessita também de agilidade e domínio das técnicas pelo pessoal do laboratório. Outra limitação seria a disponibilidade de broncoscopia, tanto de aparelhagem quanto do profissional habilitado (DIRETRIZES BRASILEIRAS PARA TRATAMENTO DE PNEUMONIAS ADQUIRIDAS NO HOSPITAL E DAS ASSOCIADAS À VENTILAÇÃO MECÂNICA, 2007).

Uma porcentagem significativa de pacientes com PAV apresentam bacteremia. Uma probabilidade baixa de 26% é observada no isolamento do mesmo agente etiológico na hemocultura e na pneumonia identificado no lavado broncoalveolar. Porém, a hemocultura apresenta um valor preditivo positivo de 73%. A positividade das hemoculturas tem valor prognóstico, pois se associa com maior risco de complicações e morte. Recomenda-se a colheita de duas amostras em aerobiose, principalmente em pico de febre, em locais diferentes, com volume de 10 mL de cada amostra, preferencialmente, antes do início da antibioticoterapia (RELLO *et al.*, 2002; DIRETRIZES BRASILEIRAS PARA TRATAMENTO DE PNEUMONIAS ADQUIRIDAS NO HOSPITAL E DAS ASSOCIADAS À VENTILAÇÃO MECÂNICA, 2007).

1.4.4 Moleculares

A biologia molecular é o campo da ciência que estuda o material genético. Desde sua descoberta, inúmeros avanços foram obtidos, principalmente técnicas que permitem isolamento, manipulação, amplificação e sequenciamento do material genético. Com isso, grandes avanços ocorreram em diversas áreas, incluindo o diagnóstico molecular de patógenos em doenças infecciosas (MOREIRA, 2017 *apud* WATSON *et al.*, 2009).

Dentre as técnicas disponíveis para detecção de alvos patogênicos associados às infecções, destaca-se a reação em cadeia da polimerase (PCR), a técnica mais utilizada no diagnóstico molecular de microrganismos. Essa pode ser subdividida em três gerações: PCR-convencional (cPCR) ou 1º geração; PCR em

tempo real (qPCR) ou PCR de 2º geração e a PCR droplet digital (ddPCR) ou de 3º geração (LEE *et al.*, 2008; YONG *et al.*, 2009; KUYPERS *et al.* 2017) . Porém, todas requerem em sua reação a identificação específica de pelo menos parte do DNA alvo, os chamados iniciadores e sondas, que se acoplam especificamente com a sequência alvo pesquisada (MACKAY *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2001). Algumas limitações são observadas, como falta de capacidade quantitativa e reagentes críticos para operador em PCR Convencional ou PCR de 1º geração (LEE *et al.*, 2008). O desenvolvimento da qPCR, ou PCR de 2º geração, proporcionou um avanço significativo na biotecnologia para o diagnóstico de infecções, favorecendo a velocidade, reprodutibilidade e capacidade de realizar a quantificação dos microrganismos (YONG *et al.*, 2009). A PCR droplet digital (ddPCR) ou de 3º geração se assemelha a qPCR, contudo revoluciona ao quantificar sem a necessidade de construção de uma curva padrão, realizando a sua quantificação pela medição através de Ct (MOREIRA, 2017 *apud* KUYPERS *et al.* 2017).

Tecnologias adjacentes, como os painéis de Pneumonia BioFire® FilmArray® que detectam e identificam múltiplos patógenos respiratórios virais (8 alvos) e bacterianos (18 alvos), além de genes de resistência antimicrobiana (7 alvos) e o painel Curretis Unyvero (Curetis, Holzgerlingen, Alemanha), um teste baseado em PCR multiplex, capaz de detectar 18 alvos bacterianos e um alvo fúngico, além de 22 marcadores de resistência, foram desenvolvidos e avaliados, demonstrando boa correlação com a cultura microbiológica convencional (KYRIAZOPOULOU *et al.*, 2021; JAMAL *et al.*, 2014)

Outra tecnologia, o DNA *flow chip* (Master Diagnóstica, Granada, Espanha) é um ensaio baseado em microarranjo de DNA, para diagnóstico etiológico em amostras de hemocultura positiva. A tecnologia é baseado em uma amplificação por PCR multiplex usando primers biotinilados, seguido por uma hibridização reversa (*Dot-Blot*) semi-automatizada em membrana de nylon poroso (chip) contendo oligonucleotídeos (sondas) específicos para detectar marcadores moleculares. Os alvos de DNA biotinilados (amplicons) suportam a membrana por um fluxo de vácuo vertical, que estimula a interação com suas sondas de DNA imobilizadas na membrana permeável, em um ambiente tridimensional, nas quais ocorre a hibridização. O sinal de hibridização é desenvolvido por uma reação colorimétrica imunoenzimática (estreptavidina-fosfatase alcalina e cromógeno NBT-BCIP). A

reação substrato-cromógeno gera um precipitado insolúvel de coloração escura (intensidade cinza) na posição em que o fragmento amplificado de PCR hibridiza com a sonda específica. O processo é feito de maneira semi-automatizada na plataforma hybriSpot e os resultados são analisados com o software hybriSoft (GALIANA, *et al.*, 2017). Este painel tem a capacidade de detectar 36 espécies bacterianas e uma levedura, além de 20 marcadores genéticos de resistência a antibióticos envolvidos na resistência à meticilina/oxacilina, vancomicina e relacionados aos mecanismos de resistência a β -lactâmicos e produção de carbapenemases (GALIANA, *et al.*, 2017; MOBIUS LIFE, 2018).

2 JUSTIFICATIVA

No diagnóstico de pneumonia, parâmetros clínicos e valores laboratoriais são sensíveis, mas inespecíficos para identificação da etiologia da infecção microbiana. Os sinais radiográficos comumente associados à pneumonia não fornecem necessariamente evidências de processos infecciosos bacterianos. O exame microbiológico de amostras do trato respiratório inferior é estabelecido como um método confiável para o diagnóstico direcionado de infecções pulmonares. Porém, as culturas geralmente precisam de 2 a 5 dias para fornecer um resultado definitivo sobre a identificação do agente etiológico e suscetibilidade a antimicrobianos. Esta limitação é intrínseca aos métodos convencionais de diagnóstico e ao período de tempo decorrido do encaminhamento das amostras após a suspeita clínica e o crescimento e identificação. Além disso, devido à gravidade da condição clínica e ao pior prognóstico associado ao atraso na antibioticoterapia, a amostragem direta do trato respiratório geralmente ocorre após a instituição da antibioticoterapia empírica (BODEY e ROLSTON, 2001; JANH *et al.*, 2015; BONAFEDE *et al.*, 2012).

Baseado nesta premissa, é necessário o aprimoramento das técnicas e metodologias empregadas no diagnóstico da infecção pulmonar e o microrganismo associado, que precisam ser rápidas e específicas. É inegável que quanto mais precoce o diagnóstico etiológico, mais eficiente será o tratamento, evitando-se o uso inadequado e abusivo de antibióticos e, por consequência, a seleção de linhagens multirresistentes e o aumento da incidência de óbito por pneumonia. Resultados microbiológicos rápidos e específicos via biologia molecular podem permitir a administração de antibioticoterapia apropriada, a suspensão ou a adaptação da terapia antimicrobiana e, portanto, a diminuição dos custos e riscos decorrentes da antibioticoterapia empírica. Buscamos, neste projeto, dissertar sobre a adaptação e validação analítica e clínica de um painel bacteriano molecular já registrado na Europa, EUA e ANVISA, para pesquisa de genes bacterianos, em amostras primárias de via aérea inferior em pacientes portadores de pneumonia, principalmente nosocomiais e pneumonias associados à ventilação mecânica, além dos principais genes de resistência associados a esses microrganismos. Desta forma, busca-se uma otimização rápida de diagnóstico etiológico e genes de

resistência para futura implementação na rotina de diagnóstico laboratorial de pneumonia.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Validar, avaliar e comparar os resultados finais da adaptação de um painel genético bacteriano e de genes codificadores de resistência (sistema flow chip) com resultados da cultura microbiológica convencional para o diagnóstico etiológico de pneumonia.

3.2 Objetivos específicos

- Padronizar e validar analiticamente os procedimentos de adaptação do painel genético molecular em amostras primárias de via aérea inferiores.
- Relacionar os microrganismos e os perfis de suscetibilidade a antimicrobianos em amostras primárias de via aérea inferiores, empregando-se a metodologia convencional, através da análise de dados de prontuário e resultados laboratoriais.
- Identificar os microrganismos e a presença de genes codificadores de resistências as classes de antimicrobianos carbapenêmicos, penicilinas, glicopeptídeos e cefalosporina de 1ª e 3ª geração, em amostras primárias de via aérea, através do diagnóstico laboratorial empregando-se métodos moleculares (*Flow chip*).
- Validar e avaliar o desempenho do ensaio molecular através da comparação entre os resultados da microbiologia clássica *versus* método molecular (*Flow chip*).
- Otimizar o diagnóstico etiológico e de genes codificadores de resistência em amostras primárias de vias aéreas inferiores para futura implementação na rotina de diagnóstico laboratorial de pneumonias.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção dos espécimes clínicos e laudos laboratoriais

O estudo retrospectivo foi realizado a partir de resultados de exames de biologia molecular em amostras respiratórias encaminhadas ao laboratório Símile Medicina Diagnóstica, localizado na R. São Paulo, 1932 - salas 601/602 - Lourdes, Belo Horizonte - MG, 30170-132, proveniente de pacientes com suspeita de Pneumonia associada à ventilação mecânica ou pneumonia nosocomial no período entre 2018 e 2021. Os espécimes foram devidamente identificados, acondicionados e encaminhados ao laboratório para processamento no prazo máximo de 4 dias após a coleta. As amostras foram armazenadas a uma temperatura de 2°C a 8°C e, após processamento, foram armazenadas em ambiente com temperatura variando entre -60°C a -80°C. As amostras clínicas utilizadas neste estudo foram coletadas pela equipe de fisioterapia do centro de terapia intensiva (UTI) do hospital Felício Rocho seguindo os protocolos estabelecidos pelo hospital de acordo com a matriz respiratória encaminhada para o diagnóstico. No hospital Felício Rocho, localizado na Av. do Contorno, 9530. Belo Horizonte (MG), foram colhidos informações clínicas, via análise de fichas e prontuários, dos casos que tiveram suas amostras encaminhadas, sendo selecionados aqueles que continham informações sobre os casos, seguindo as diretrizes sobre pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV)(2006), presença de sinais clínicos/Laboratoriais (aumento do número de leucócitos totais, aumento e mudança de aspecto de secreção traqueal, piora ventilatória usando principalmente como referência a relação PaO₂/FiO₂, febre ou hipotermia), sinais radiológicos e, principalmente, resultados da análise microbiológica clássica. Amostras de pacientes que não apresentaram resultados da cultura disponível foram excluídas do estudo.

4.2 Aspectos éticos

Este trabalho foi desenvolvido em cooperação técnica entre o Hospital Felício Rocho e o Laboratório Símile. Este projeto foi submetido ao comitê de ética em pesquisa do Hospital Felício Rocho/MG e ao Comitê de Ética e Pesquisa - COEP/UFMG sendo eles aprovados sob o número CAAE 51244921.00000.5125.

4.3 Coleta de amostras clínicas

Lavado Broncoalveolar (BAL)

O broncoscópico foi dirigido para o segmento comprometido. O material para cultura foi obtido antes de eventuais biópsias para evitar excesso de sangue. As alíquotas foram armazenadas em recipientes distintos. Foram utilizados 100 mL de salina estéril não-bacteriostática, instiladas em alíquotas de 20 mL e aspiradas em recipiente estéril. A primeira alíquota foi colocada em frasco identificado como primeira amostra.

Mini-Lavado Broncoalveolar (mini-BAL)

Em primeiro lugar, um cateter de lavagem (Combicath™; Plastmed, Saint-Leu-La Forêt, França) foi avançado no tubo endotraqueal até que uma resistência suave fosse encontrada. Em seguida, a bainha protetora na extremidade distal do cateter foi destacada e o cateter foi avançado ao longo da árvore traqueobrônquica. Por fim, 20 ml de NaCl a 0,9% foram injetados pelo cateter e, em seguida, aspirados pelo mesmo injetor.

Aspirado Traqueal (AT)

Como particularidade importante, as amostras de aspirado de secreção traqueal foram interpretadas da mesma forma que as de escarro, usando critérios de seleção da qualidade do material. Amostras que não revelem bactérias após coloração de Gram e exame ao microscópio com imersão e/ou 10 células do epitélio escamoso após observação ao microscópio óptico em menor magnificação foram rejeitadas. Foi colhido material representativo, em recipiente estéril ou em frasco estéril acoplado a sistema de sucção.

4.4 Extração e quantificação de DNA genômico

A extração de DNA a partir das secreções respiratórias provenientes de pacientes com suspeita de pneumonia associada à ventilação mecânica ou pneumonia nosocomial foi realizado utilizando o kit de extração Biopur mini *spin plus* (Biometrix Diagnostica, Paraná, Brasil) seguindo o protocolo adaptado recomendado pelo fabricante conforme descrito a seguir:

Um tratamento prévio com *Dithiothreitol* (DTT)(Thermo Scientific™), um agente mucolítico, na proporção 1:1 foi realizado. O processo causa ruptura de ligações dissulfeto de proteínas, favorecendo a liquefação da amostra. Uma alíquota de 500 µL da amostra primária foi adicionada a 500µL de DTT (0,1M). Um aquecimento a 37°C por 15 minutos, em termobloco sob agitação, foi realizado para potencializar a ação mucolítica do DTT. Posteriormente a alíquota de 1000 µL foi centrifugada a 2800 x *g* durante 10 minutos para sedimentação celular. Logo em seguida 800 µL do sobrenadante foi desprezado e o restante do material (*pellet*) seguiu para o processo de extração de DNA.

Para a extração, foram adicionados 25 µL de Proteinase K (0,6 mg) 200 µL de amostra e 200 µL Tampão de Lise S (Hidrocloreto de guanidina 36-50%, Tween 20 10-33%) e homogeneizado vigorosamente em vórtex por 20 segundos. Logo em seguida a solução foi incubada a 70°C por 15 minutos. Após esse período foi adicionado 210 µL de Etanol (96-100%)(EMSURE®) e homogeneizado por pipetagem reversa por 10 vezes. Em seguida, a mistura foi transferida para um tubo Spin S (coluna com membrana de sílica) e centrifugada por 1 minuto a 11.000 x *g*. Em seguida, o filtrado foi descartado e sobre a coluna foi adicionado 500 µL de Tampão de Lavagem SI (Hidrocloreto de guanidina 36-50%, propanol 20-50%) e centrifugado por 1 minuto a 11.000 x *g*. Em seguida, o filtrado foi descartado e sobre a coluna foram adicionados 600 µL de Tampão de Lavagem SII e centrifugado por um minuto a 11.000 x *g*. Posteriormente, o filtrado foi descartado e a coluna vazia foi centrifugada a 11.000 x *g* por 1 minuto para remover o etanol residual. Por fim, foi adicionado 100 µL de tampão de eluição (5mM Tris /HCl, pH 8.5) previamente aquecido a 70°C sobre a membrana de sílica. Então, o material foi incubado por 3

minutos à temperatura ambiente e posteriormente centrifugado por 1 minuto a 11.000 x g para obtenção do extraído purificado.

A quantificação do DNA foi realizada utilizando aparelho *Qubit® Fluorometer* (Invitrogen, Califórnia, EUA). O material extraído estava na faixa de quantificação entre 0,02 ng/uL a 200 ng/uL (faixa de quantificação do equipamento). Contudo, a concentração de uso foi de 5 ng/uL (20 ng de DNA final por reação). A concentração foi ajustada com diluição em água ultrapura para biologia molecular (© Phoneutria Biotecnologia, Belo Horizonte, Brasil) para amostras com concentrações superiores a 5 ng/uL de DNA.

4.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR) e Hibridização Reversa (Dot Blot)

A amplificação do material genético dos patógenos alvo e dos genes de resistência ocorreu simultaneamente em duas reações multiplex independentes. A primeira continha os primers biotinilados com os alvos bacterianos e fúngico e alguns genes de resistência e a segunda contém os primers biotinilados para os principais genes de resistência (Tabela 1). O volume final das reações foi de 40µL contendo: 36µL de uma solução comercial pronta (Solução de primers biotinilados, Enzima DNA Polimerase *Hot Start*, Enzima Uracila DNA Glicosilase) (Master Diagnóstica, Granada, Espanha) acrescido de 20 ng de DNA alvo. A ciclagem térmica foi realizada no termociclador GeneAmp PCR System 9700 (*Applied Biosystems*), sendo uma estabilização inicial de 25°C por 10 minutos, acompanhada de uma desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de três passos consecutivos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 45 segundos e uma extensão de 72°C por 1 minuto, além de uma extensão final de 72°C por 7 minutos e uma etapa final a 8°C para conservação, seguindo a recomendação do fabricante.

Tabela 1: Distribuição dos alvos nos Mix de PCR multiplex. Fonte: MOBIUS LIFE, 2018 Adaptado.

Mix	Alvos
	<i>Staphylococcus Coagulase Negativo, Staphylococcus aureus, Streptococcus spp., Streptococcus pneumoniae, Streptococcus agalactiae,</i>

1	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Enterococcus</i> spp., <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Neisseria meningitidis</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Serratia marcescens</i> , espécies de <i>Enterobacteriaceae</i> e <i>Proteus</i> spp, <i>Candida albicans</i> , <i>Candida</i> spp, e os genes <i>mecA</i> , <i>vanA</i> , <i>vanB</i> , <i>blaSHV</i> , <i>blaCTX-M</i> e Controle Interno (CI).
2	Resistência para carbapenêmicos: <i>kpc</i> , <i>sme</i> , <i>nmc/imi</i> , <i>ges</i> , <i>vim</i> , <i>gim</i> , <i>spm</i> , <i>ndm</i> , <i>sim</i> , <i>imp</i> , <i>oxa 23</i> , <i>oxa 24</i> , <i>oxa 48</i> , <i>oxa 51</i> , <i>oxa 58</i> e Controle exógeno.

Para o processo de hibridização, uma desnaturação inicial a 95°C foi realizada em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems), para proporcionar o rompimento das pontes de hidrogênio e abertura da dupla hélice de DNA amplificado. Após a desnaturação, os mix de PCR foram misturados em uma solução de Hibridização (Reagente A) e sobreposto sobre a membrana de nylon (chip) contendo as sondas específicas para detectar os produtos da PCR, e incubados a 51°C em uma plataforma de hibridização HS12 (Master Diagnóstica, Granada, Espanha; Mobius Life, Paraná, Brasil; Anvisa: 80502070046) por 8 minutos para ligação do amplicon com sonda. Em seguida, a solução foi removida automaticamente por vácuo. Após esse tempo, uma solução de parada de reação (Reagente B) foi adicionada sobre o Chip, e deixado sob incubação a 29°C por 5 minutos. A solução foi removida automaticamente por vácuo. Uma solução de Estreptavidina-Fosfatase Alcalina (Reagente C) foi acrescentada sobre o Chip e deixado sob incubação a 29°C por 5 minutos. Em seguida, uma solução de lavagem (Reagente D) foi aplicada sobre a membrana de nylon (chip) para remoção de substratos que não se ligaram com a biotina presente nos primers. A solução foi removida automaticamente por vácuo. Após a lavagem, uma solução de cromógeno (NBT-BCIP - *5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate* e *nitro blue tetrazolium*) e substrato (Reagente E) foi adicionada ao chip e incubada a 36°C por 8 minutos, onde ocorreu uma reação enzimática colorimétrica (complexo biotina-estreptavidina-fosfatase alcalina e cromógeno NBT-BCIP). A reação do substrato-cromógeno gera um precipitado de coloração cinza escuro (Intensidade de cinza) na posição em que o fragmento amplificado hibridiza com a sonda específica. Após remoção da solução por vácuo, uma última lavagem foi realizada com tampão de lavagem (Reagente F), finalizando o processo de hibridização.

Em seguida, o chip foi desacoplado da plataforma de hibridização HS12 e a imagem do chip então foi capturada pela câmera acoplada e analisada na plataforma pelo *software hybrisoft* que identifica o padrão de pontos no mapa que reagiram na membrana (Figura 2). Cada padrão de pontos está associado a um microrganismo ou gene de resistência, e o *software hybrisoft* emite um resultado. O resultado é determinado através do sinal colorimétrico imunoenzimático no padrão de pontos no mapa e o equipamento interpreta a leitura semi quantitativa através da intensidade cinza, que é utilizado pelo mesmo para definir os resultados em positivo e negativo para cada alvo presente no chip. De acordo com a configuração prévia do equipamento, o *cut-off* de intensidade de cinza de 4 é estabelecido para determinação do positivo.

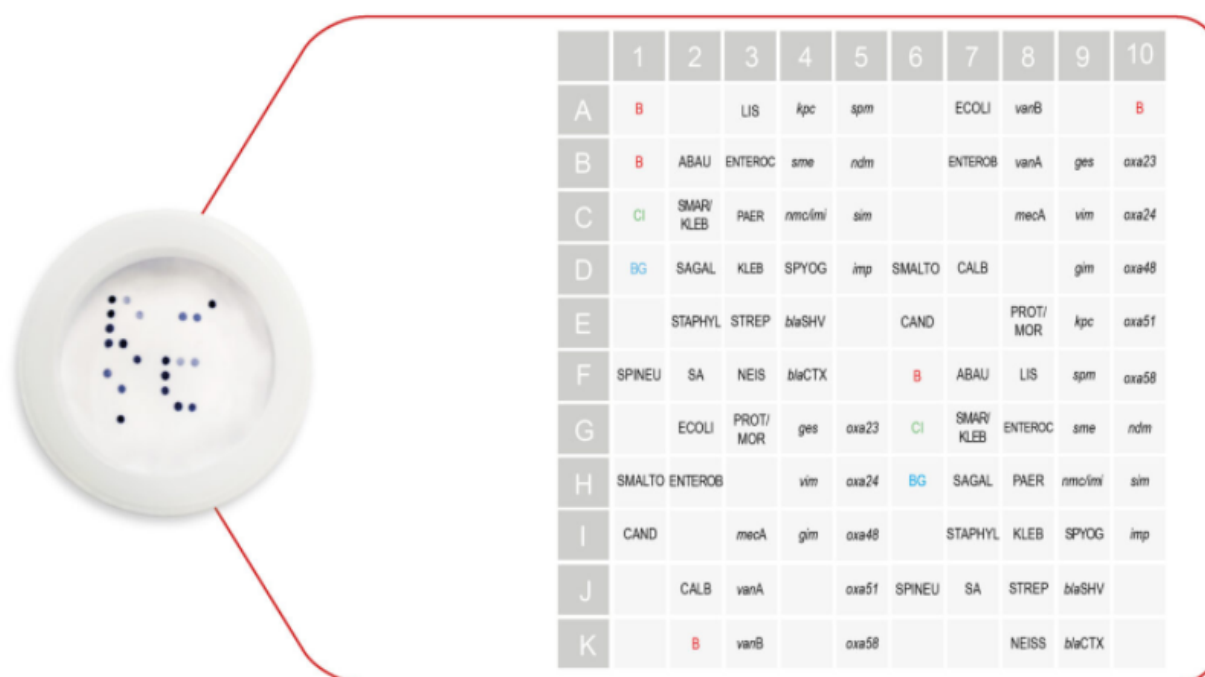


Figura 2: Distribuição de cada sonda no Chip. Todas as sondas alvo são duplicadas no mapa e um resultado é considerado positivo se ambos os sinais forem detectados. Controles de extração, amplificação e hibridização respectivamente: Beta-Globina (BG), Controle Interno (CI) e Controle Biotina (B) Fonte: (GALIANA, *et al.*, 2017; MOBIUS LIFE, 2018).

4.6 Validação e avaliação de desempenho analítico

4.6.1 Testes para determinação do limite inferior de detecção e pontos altos superiores de detecção.

Para realização dos testes analíticos foram utilizados padrões de DNA sintéticos e DNA genômico dos microrganismos detectados pelo kit e fornecidos pelo fabricante (Mobius Life Science Comércio de Produto para Laboratórios Ltda, Paraná, Brasil) nas concentrações de 10^7 a 10^3 cópias/ μ L. A listagem dos padrões fornecidos, bem como as respectivas concentrações disponibilizadas estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Alvos sintéticos ou genômicos e as respectivas concentrações disponibilizados pelo fabricante.

DNA sintético ou genômico	Concentração estoque (cópias/ μ l)	Concentração a ser testada para reproduzir LoDs do kit em amostras respiratórias (cópias/ μ l)
<i>S. epidermidis</i> (DNA sintético)	10^7	40 c/ μ l
<i>mecA</i> (DNA sintético)	10^7	4 c/ μ l
<i>S. aureus</i> (DNA sintético)	10^7	4 c/ μ l
<i>S. pneumoniae</i> (DNA genômico)	10^4	4 c/ μ l
<i>S. agalactiae</i> (DNA sintético)	10^7	20 c/ μ l
<i>S. pyogenes</i> (DNA genômico)	10^3	4 c/ μ l
<i>L. monocytogenes</i> (DNA genômico)	10^4	4 c/ μ l
<i>E. faecalis</i> (DNA sintético)	10^7	40 c/ μ l
<i>E. faecium</i> (DNA sintético)	10^7	40 c/ μ l
<i>P. aeruginosa</i> (DNA sintético)	10^7	4 c/ μ l
<i>A. baumannii</i> (DNA sintético)	10^7	4 c/ μ l
<i>N. meningitidis</i> (DNA sintético)	10^7	200 c/ μ l
<i>S. maltophilia</i> (DNA sintético)	10^7	4 c/ μ l
<i>E. coli</i> (DNA genômico)	10^4	4 c/ μ l
<i>K. pneumoniae</i> (DNA sintético)	10^7	40 c/ μ l

<i>S. marcescens</i> (DNA sintético)	10 ⁷	4 c/μl
<i>E. cloacae</i> (DNA genômico)	10 ⁷	4 c/μl
<i>P. mirabilis</i> (DNA sintético)	10 ⁷	4 c/μl
<i>C. albicans</i> (DNA genômico)	10 ³	4 c/ML

Para realização dos testes de determinação do Limite inferior de detecção (LOD) dos alvos na matriz respiratória em avaliação, foram considerados os valores de referência obtidos e disponibilizados na validação do kit na matriz de hemocultura positiva, conforme relatório de validação do próprio fabricante (Vitro master diagnóstica, Sevilha, Espanha) (Tabela 2). Os testes com os controles sintéticos foram realizados conforme citado anteriormente. A determinação de pontos altos de detecção foi realizada a partir da concentração 10 vezes superior ao limite inferior de detecção determinada por alvo.

A concentração de uso da amostra teste para determinação do limite inferior de detecção foi realizada a partir da diluição seriada 1:10 da solução estoque em DNA extraído previamente de amostra respiratória positiva para *Streptococcus* spp, microrganismo presente na microbiota indígena deste tipo amostral. As concentrações foram ajustadas com diluição em água de acordo com a Tabela 2.

A concentração de uso para determinação de pontos altos de detecção foi realizada a partir da diluição seriada 1:10 da solução estoque em DNA extraído previamente de amostra respiratória positiva para *Streptococcus* spp. As concentrações utilizadas foram 10 vezes superiores ao limite inferior de detecção de acordo com a Tabela 2. Os processos de amplificação e hibridização foram realizados conforme citados anteriormente.

4.6.2 Testes para determinação ótima da concentração de DNA

Foi avaliada a concentração ótima de DNA da amostra a ser inserida na reação de PCR para que não haja inibição. Para isso foram utilizadas DNA em diferentes concentrações provenientes de amostras com resultados conhecidos, para avaliar a intensidade de cinza dos pontos de hibridização.

Foi utilizado para avaliação da matriz respiratória considerada pela microbiologia convencional positiva uma amostra com resultado positivo para *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*, e para os marcadores de resistência aos antibióticos, KPC e blaSHV. A amostra positiva foi submetida a extração de DNA e cinco diferentes concentrações de DNA foram testados no ensaio (0,02 ng/μl, 0,2ng/μl, 2 ng/μl, 20 ng/μl, 200ng/μl - concentração dos testes analíticos do fornecedor). A amostra respiratória considerada pela microbiologia convencional negativa apresentou resultado negativo para todos os microrganismos considerados patogênicos, sendo que a avaliação da amostra negativa seguiu os mesmos protocolos da amostra positiva.

4.6.3 Testes para determinação da repetibilidade analítica.

Para o teste de repetibilidade analítica foram realizados testes de detecção repetindo-se 3 vezes as amostras detectadas no limite inferior de detecção para cada um dos microrganismos incluídos no painel com objetivo de comprovar o limite inferior de detecção para a matriz respiratória em avaliação. Todos os resultados foram analisados com o software Hybrid Soft v2.0, com um *cut-off* positivo de 4. Amostras com um dos pontos abaixo do *cut-off* foram consideradas negativas

4.7 Validação e avaliação de desempenho clínico

Segundo orientações estabelecidas pelos órgãos responsáveis para validação de métodos analíticos (ANVISA), os seguintes parâmetros foram analisados como critério de avaliação da metodologia para certificar que o método

produz resultados confiáveis (BRASIL, 2017; VENCIA et al., 2014; ALBANO e RAYA-RODRIGUES, 2009)

4.7.1 Testes de precisão e exatidão clínica

4.7.1.1 Repetibilidade

A repetibilidade é uma medida de concordância ou conformidade entre resultados de uma mesma rodada sob um mesmo método. É a probabilidade, em porcentagem, de se encontrar o mesmo resultado nas n amostras analisadas, sob uma mesma rodada e mesmo método, em condições de repetibilidade. Ou seja, levando em conta um mesmo operador, mesmo equipamento e tratamento dado às amostras, em curto intervalo de tempo. (ANVISA - RDC 166, 2017; ALBANO e RAYA-RODRIGUES, 2009).

Conforme FONSECA (2015), a repetibilidade foi avaliada e calculada através da comparação dos resultados obtidos de doze réplicas testadas a 100% da concentração contendo os microrganismos *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*, além dos marcadores de resistência *KPC* e *VanA* preparados individualmente. Foi calculada a repetibilidade individual de cada sonda detectada e não detectada

Conforme FONSECA, 2015 a reprodutibilidade foi avaliada e calculada através da comparação da probabilidade, em porcentagem, de se encontrar o mesmo resultado (-,-) ou (+, +), entre os resultados obtidos dos testes da mesma amostra, no mesmo laboratório, em dois dias diferentes, comparando os resultados distintos.

4.7.1.2 Precisão intermediária

A Precisão intermediária foi avaliada através da análise das médias dos resultados da intensidade da reação colorimétrica imunoenzimática obtidos dos testes da mesma amostra contendo os microrganismos *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*, além dos marcadores de resistência *KPC* e *VanA*, no mesmo laboratório, em dois dias diferentes, comparando os resultados dos dois analistas distintos. A precisão foi expressa como o desvio-padrão, variância ou

coeficiente de variação das diversas medidas, sendo dada pela equação $CV\% = (\text{desvio padrão}/\text{Valor médio das medidas}) \times 100$.

4.7.1.3 Teste de sensibilidade e especificidade clínica

Sensibilidade clínica ou sensibilidade diagnóstica é a relação entre a presença do analito na amostra e a presença de uma determinada doença ou condição. Para os propósitos de sensibilidade clínica, foi analisada a capacidade do kit em adaptação de determinar amostras verdadeiramente positivas. O cálculo de sensibilidade diagnóstica é expresso em porcentagem, calculado como $100 \times$ o número de valores positivos verdadeiros (TP) dividido na soma do número de valores positivos verdadeiros (TP) mais o número de valores falsos negativos (FN), ou seja: $100 \times TP / (TP + FN)$.

Especificidade clínica ou especificidade diagnóstica, é a relação entre a ausência do analito na amostra e a ausência de uma determinada doença ou condição. Para os propósitos de especificidade clínica, foi analisada a capacidade do kit em adaptação de determinar amostras verdadeiramente negativas. O cálculo de especificidade diagnóstica é expresso como uma porcentagem, calculado como $100 \times$ o número de valores negativos verdadeiros (TN) dividido na soma do número de valores negativos verdadeiros (TN) mais o número de valores positivos falsos (FP), ou seja: $100 \times TN / (TN + FP)$.

4.8 Normas e Análises estatísticas

Para avaliação e adaptação do painel em amostras de vias aéreas inferiores, este estudo se baseou em orientações estabelecidas pelos órgãos responsáveis para validação de métodos analíticos (ANVISA), respaldados nas resoluções da diretoria colegiada RDC N° 302, de 13 de Outubro de 2005, RDC N° 166, de 24 de Julho de 2017, ISO 16140:2003 e referências de ALBANO e RAYA-RODRIGUES, 2009.

Para as análises estatísticas, foi realizado teste de normalidade para verificar se as amostras apresentaram distribuição normal. Para avaliação da força da coincidência entre os dois grupos, foi utilizado o índice de Kappa de Cohen. Na

análise da acurácia para o diagnóstico proposto, foram utilizados os valores verdadeiros positivos e valores verdadeiros negativos. O nível de significância adotado foi de $P < 0,05$. Para a realização de todas as análises, foi utilizado o software GraphPad PRISM, GraphPad software Inc. (San Diego, CA, USA).

5. RESULTADOS

5.1 Características gerais dos pacientes

Entre o período de Novembro de 2018 a Agosto de 2021, foram coletadas 67 amostras de Lavado broncoalveolar, Mini Lavado broncoalveolar e Aspirado traqueal provenientes de 63 pacientes internados na Unidade de terapia intensiva (UTI) do Hospital Felício Rocho, em Belo Horizonte. Destes, 14 amostras foram excluídas do estudo por serem provenientes de pacientes cuja amostra não era representativa para realização do exame ou não havia resultados da cultura microbiológica disponíveis. 53 amostras se enquadravam nos critérios de inclusão do estudo. Após a coleta, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório Símile Medicina Diagnóstica, localizado na R. São Paulo, 1932 - salas 601/602 - Lourdes, Belo Horizonte - MG, 30170-132, onde foram processadas para realização do exame molecular no prazo máximo de 4 dias após a coleta do material.

Os dados sociodemográficos, representados nas Tabelas 3 e 10, demonstraram que a maioria dos pacientes eram do sexo masculino (75,47%) com idade variando entre 16 a 97 anos (média de $63,94 \pm 18,62$ anos). A matriz respiratória predominante utilizada no diagnóstico foi de Aspirado traqueal (62,26%), seguido de lavado broncoalveolar (22,64%) e mini-lavado broncoalveolar (15,10%) onde foi confirmado o diagnóstico de pneumonia em 36 casos (67,92%) com índice de mortalidade de 3,77% em dados recuperados. Não foi possível determinar a mortalidade em 26 casos, por ausência de dados ou inacessibilidade ao desfecho final de cada caso.

Tabela 3 : Características sociodemográficas dos pacientes.

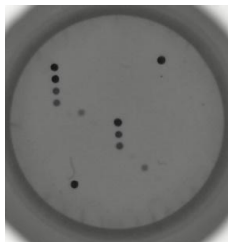
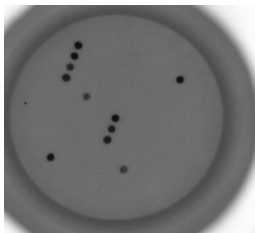
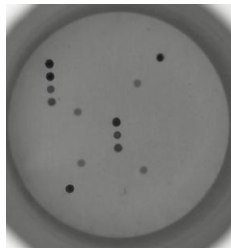
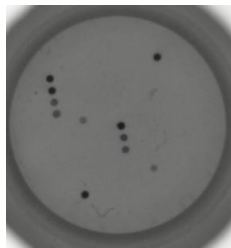
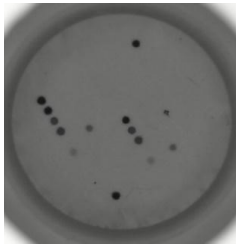
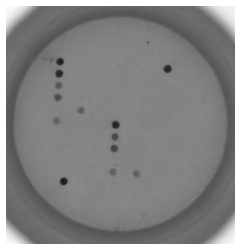
Características	Valores
Idade (anos)	63,94 ± 18,62 anos
Sexo	
Masculino	40 (75,47%)
Feminino	13 (24,53%)
Matriz respiratória	
Mini Lavado broncoalveolar	8 (15,10%)
Lavado Broncoalveolar	12 (22,64%)
Aspirado traqueal	33 (62,26%)
Pneumonia confirmada	36 (67,92%)
Mortalidade	
Óbitos	2 (3,77%)
Não informados/ Dado não disponível	26 (49,05%)

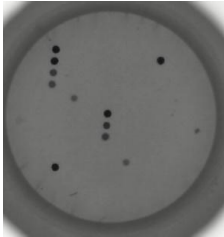
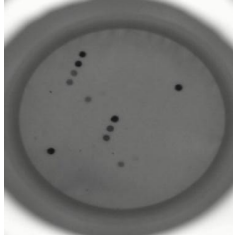
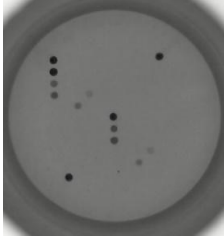
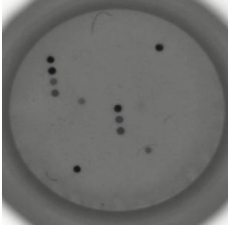
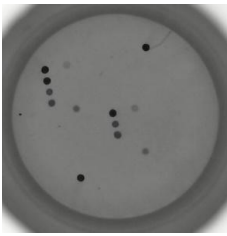
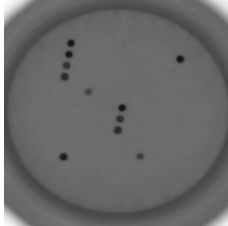
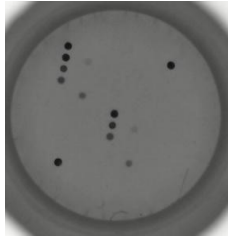
5.2 Análise dos resultados analíticos

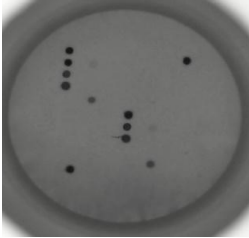
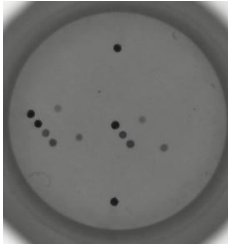
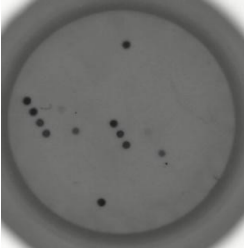
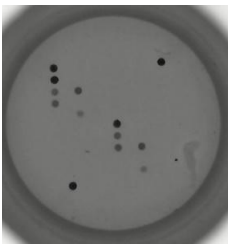
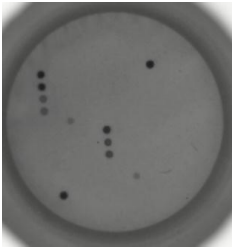
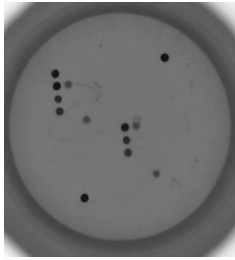
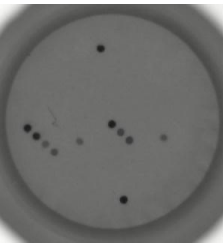
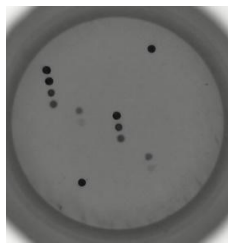
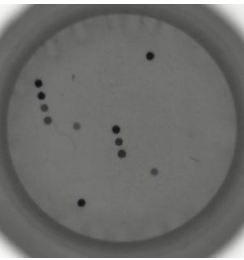
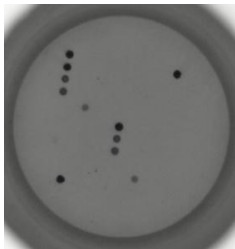
5.2.1 Resultados dos limites inferiores de detecção e pontos altos superiores de detecção.

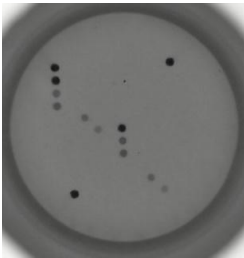
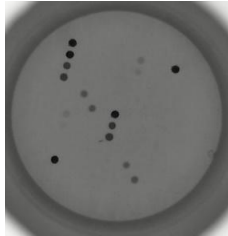
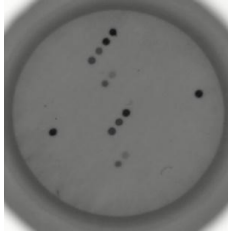
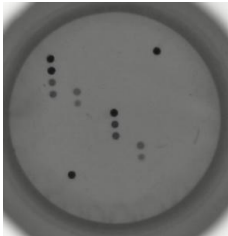
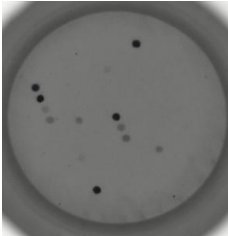
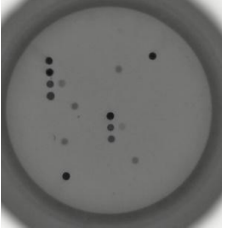
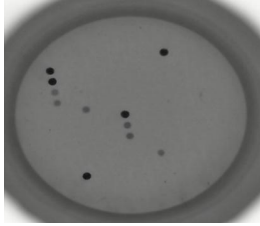
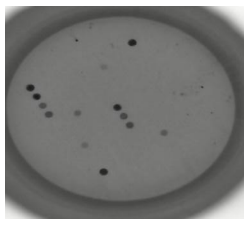
Para realização dos ensaios, utilizou-se DNA genômico previamente extraído de amostras respiratórias. Devido à presença do microrganismo *Streptococcus spp* na matriz respiratória, foi utilizada uma amostra positiva para esse microrganismo como matriz, gerando assim a presença de sua sonda nos resultados das imagens apresentadas na Tabela 4.

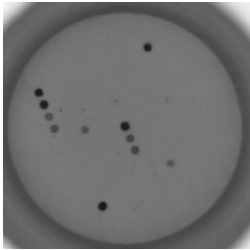
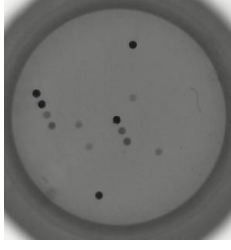
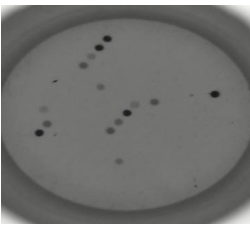
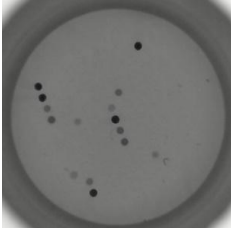
Tabela 4 : Resultados dos limites inferiores de detecção e pontos altos superiores de detecção.

Padrão sintético ou genômico	Limite inferiores de detecção	Pontos superiores de detecção	Resultados
<i>S. epidermidis</i>	N/T		Ausência da sonda de <i>S. epidermidis</i> na concentração de 40 cópias/ul. Para avaliação da interferência do <i>Streptococcus spp</i> este alvo será avaliado em outras condições.
mecA			Ausência da sonda de mecA na concentração de 4 cópias/ul. Detecção da sonda de mecA na concentração de 40 cópias/ul.
<i>S. aureus</i>	N/T		Ausência da sonda de <i>S. aureus</i> na concentração de 40 cópias/ul. Para avaliação da interferência do <i>Streptococcus spp</i> este alvo será avaliado em outras condições.
<i>S. pneumoniae</i>			Detecção da sonda de <i>S. pneumoniae</i> na concentração de 4 cópias/ul. Detecção da sonda de <i>S. pneumoniae</i> na concentração de 40 cópias/ul.

<i>S. agalactiae</i>	N/T		Ausência da sonda de <i>S. agalactiae</i> na concentração de 20 cópias/ul. Para avaliação da interferência do <i>Streptococcus spp</i> este alvo será avaliado em outras condições.
<i>S. pyogenes</i>			Detecção da sonda de <i>S. pyogenes</i> abaixo do cut off na concentração de 4 cópias/ul. Detecção da sonda de <i>S. pyogenes</i> concentração de 40 cópias/ul.
<i>L. monocytogenes</i>			Detecção da sonda de <i>L. monocytogenes</i> abaixo do cut off na concentração de 4 cópias/ul. Detecção da sonda de <i>L. monocytogenes</i> na concentração de 40 cópias/ul.
<i>E. faecalis</i>			Ausência da sonda de <i>E. faecalis</i> na concentração de 40 cópias/ul. Detecção da sonda de <i>E. faecalis</i> na concentração de 400 cópias/ul.

<i>E. faecium</i>			<p>Detecção da sonda de <i>E. faecium</i> na concentração de 40 cópias/ul.</p> <p>Detecção da sonda de <i>E. faecium</i> na concentração de 400 cópias/ul.</p>
<i>P. aeruginosa</i>			<p>Detecção da sonda de <i>P. aeruginosa</i> na concentração de 4 cópias/ul.</p> <p>Detecção da sonda de <i>P. aeruginosa</i> na concentração de 40 cópias/ul.</p>
<i>A. baumannii</i>			<p>Ausência da sonda de <i>A. baumannii</i> na concentração de 4 cópias/ul.</p> <p>Detecção da sonda de <i>A. baumannii</i> na concentração de 40 cópias/ul.</p>
<i>N. meningitidis</i>			<p>Ausência da sonda de <i>N. meningitidis</i> na concentração de 200 cópias/ul.</p> <p>Detecção da sonda de <i>N. meningitidis</i> na concentração de 2000 cópias/ul.</p>
<i>S. maltophilia</i>			<p>Ausência da sonda de <i>S. maltophilia</i> na concentração de 4 cópias/ul.</p> <p>Ausência da sonda de <i>S. maltophilia</i> na concentração de 40 cópias/ul.</p> <p>Para avaliação da interferência do <i>Streptococcus spp</i> este alvo será avaliado em outras condições.</p>

<i>E. coli</i>			<p>Ausência de detecção da sonda de <i>E. coli</i>. Detecção da sonda de gene de Resistência B-Lactamase CTXM na concentração de 4 cópias/ul. Detecção da sonda de gene de Resistência B-Lactamase CTXM na concentração de 40 cópias/ul. Detecção de apenas uma das sondas de <i>E. coli</i>.</p>
<i>K. pneumoniae</i>			<p>Presença da sonda de <i>K. pneumoniae</i> na concentração de 40 cópias/ul. Detecção da sonda de <i>K. pneumoniae</i> na concentração de 400 cópias/ul.</p>
<i>S. marcescens</i>			<p>Ausência da sonda específica para <i>S. marcescens</i> na concentração de 4 cópias/ul. Detecção da sonda de <i>S. marcescens</i> na concentração de 40 cópias/ul.</p>
<i>E. cloacae</i>			<p>Ausência da sonda de <i>E. cloacae</i> na concentração de 4 cópias/ul. Detecção da sonda de <i>E. cloacae</i> na concentração de 40 cópias/ul.</p>

<i>P. mirabilis</i>			Ausência da sonda de <i>P. mirabilis</i> na concentração de 4 cópias/ul. Detecção da sonda de <i>P. mirabilis</i> na concentração de 40 cópias/ul.
<i>C. albicans</i>			Detecção da sonda de <i>C. albicans</i> e <i>C. spp.</i> na concentração de 4 cópias/ul. Detecção da sonda de <i>C. albicans</i> na concentração de 40 cópias/ul.

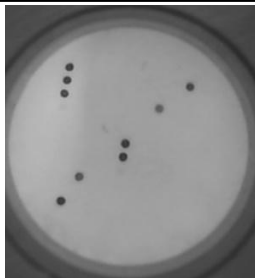
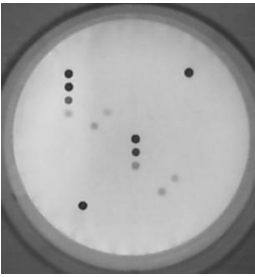
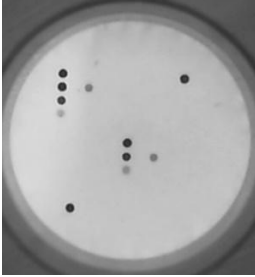
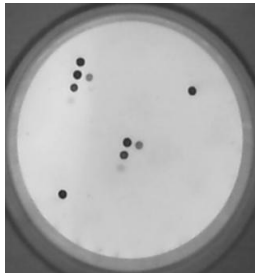
Os resultados dos testes do limite inferior de detecção dos alvos *K. pneumoniae*, *S. pneumoniae*, *E. faecium*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* apresentaram sondas com intensidade abaixo do *cut off* de detecção do software, deste modo foram prosseguidos os testes com mais réplicas para avaliar a repetibilidade do Limite de detecção mantendo a mesma matriz.

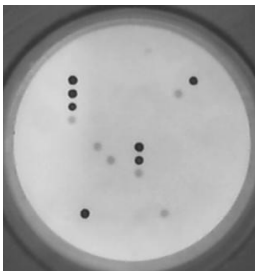
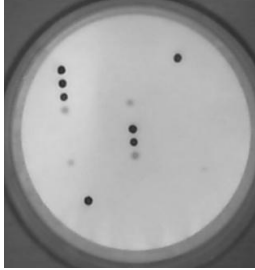
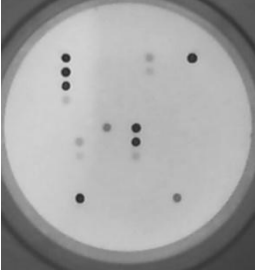
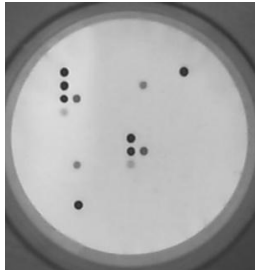
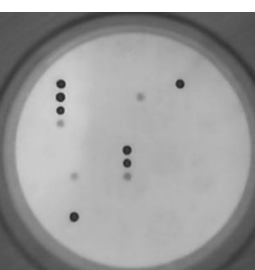
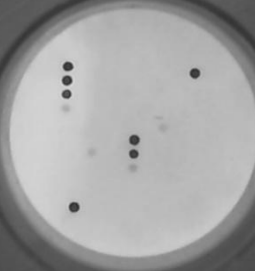
Os sinais dos testes do limite inferior de detecção dos demais alvos, *mecA*, *S. pyogenes*, *E. faecalis*, *A. baumannii*, *N. meningitidis*, *S. maltophilia*, *E. coli*, *S. marcescens*, *E. cloacae* e *P. mirabilis* não foram detectados, sendo que suspeitou-se da interferência do *Streptococcus spp.* presente na matriz biológica utilizada. Para investigação, foi realizado um novo teste em outra matriz de amostra respiratória, com total ausência de microrganismo para avaliação do limite inferior de detecção destes alvos, ou foi realizado diretamente o aumento da concentração do Limite inferior de detecção em 3x, conforme recomendação do próprio fabricante do produto, para os alvos *S. aureus* ou *L. monocytogenes*

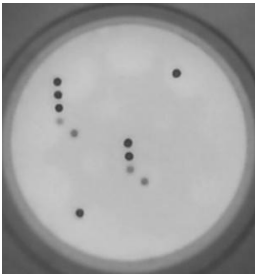
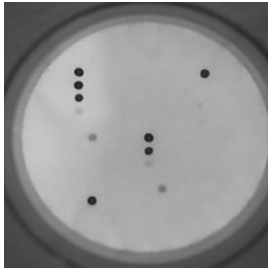
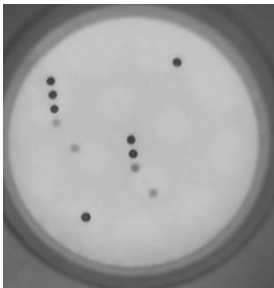
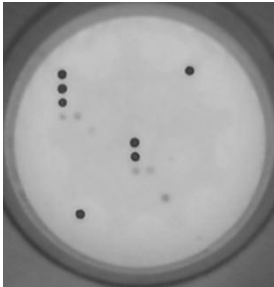
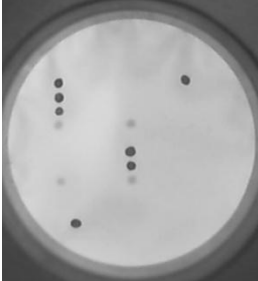
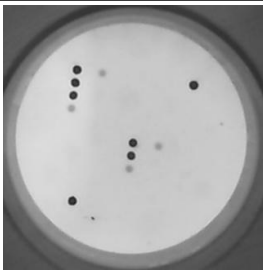
Suspeitou-se que a presença de *Streptococcus spp.* na matriz biológica utilizada poderia ser um interferente para a avaliação das amostras *S. epidermidis*, *S. aureus*, *S. agalactiae* e *S. maltophilia*, visto que estas não foram detectadas na avaliação com alta concentração do alvo. Para investigação, foi realizada a detecção destes alvos na mesma concentração em outra matriz de amostra respiratória sem a presença de nenhum microrganismo conforme demonstrado na Tabela 5.

Apesar da possível interferência do material genômico de *Streptococcus spp.* na avaliação da faixa de detecção de alguns alvo, os limites de detecção foram estabelecidos para todas as sondas de microrganismos presente no painel, mais o marcador de resistência *mecA*. As diferenças entres os valores de limite de detecção não foram estatisticamente significativas pela alteração da matriz do diagnóstico (valor de $P= 0,224$).

Tabela 5 : Resultados das repetições dos testes de determinação do limites inferiores de detecção e pontos altos superiores de detecção.

Padrão sintético ou genômico	Limite inferiores de detecção	Pontos superiores de detecção	Resultados
<i>mecA</i>		-	Presença da sonda de <i>mecA</i> na concentração de 4 cópias/ul.
<i>S. pyogenes</i>		-	Presença da sonda de <i>S. pyogenes</i> na concentração de 4 cópias/ul.
<i>E. faecalis</i>		-	Presença da sonda de <i>E. faecalis</i> na concentração de 40 cópias/ul.
<i>A. baumannii</i>		-	Presença da sonda de <i>A. baumannii</i> na concentração de 4 cópias/ul.

<i>N. meningitidis</i>		-	Presença da sonda de <i>N. meningitidis</i> na concentração de 200 cópias/ul.
<i>S. maltophilia</i>		-	Presença da sonda de <i>S. maltophilia</i> na concentração de 4 cópias/ul.
<i>E. coli</i>		-	Presença da sonda de <i>E. coli</i> e do gene de Resistência B-Lactamase CTXM na concentração de 4 cópias/ul.
<i>S. marcescens</i>		-	Presença da sonda de <i>S. marcescens</i> na concentração de 4 cópias/ul.
<i>E. cloacae</i>		-	Presença da sonda de <i>E. cloacae</i> na concentração de 4 cópias/ul.
<i>P. mirabilis</i>		-	Presença da sonda de <i>P. mirabilis</i> na concentração de 4 cópias/ul.

<i>S. epidermidis</i>	-		Detecção da sonda de <i>S. epidermidis</i> na concentração de 40 cópias/ul.
<i>S. aureus</i>			Presença da sonda de <i>S. aureus</i> após aumentar concentração para 12 cópias/ul. Detecção da sonda de <i>S. aureus</i> na concentração de 40 cópias/ul.
<i>S. agalactiae</i>	-		Detecção da sonda de <i>S. agalactiae</i> na concentração de 200 cópias/ul.
<i>S. maltophilia</i>	-		Detecção da sonda de <i>S. maltophilia</i> na concentração de 40 cópias/ul.
<i>L. monocytogenes</i>		-	Presença da sonda de <i>L. monocytogenes</i> após aumentar concentração para 12 cópias/ul.

5.2.2 Resultados da determinação ótima da quantidade de DNA

Os resultados dos testes de determinação ótima de quantidade de DNA na amostra positiva apresentou detecção dos alvos *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*, conforme resultado da

microbiologia convencional, e para os marcadores de resistência aos antibióticos, KPC e blaSHV em todas as concentrações testadas, contudo os resultados ficaram abaixo do cut off para concentrações inferiores a 2 ng/reacção. Os resultados na amostra negativa apresentaram detecção para a sonda de *Streptococcus spp.* e *Enterobacteriaceae*, por se tratar de microrganismos da microbiota da amostra. Ela foi considerada para avaliação dos resultados, conforme demonstrado na Figura 3. Os resultados na amostras negativas apresentaram detecção da sonda *Streptococcus spp.* e *Enterobacteriaceae* até a concentração de 20 ng/ reacção, concentrações inferiores não apresentaram detecções. Ambos os resultados demonstraram concentração ótima de DNA de 20 ng/reacção.

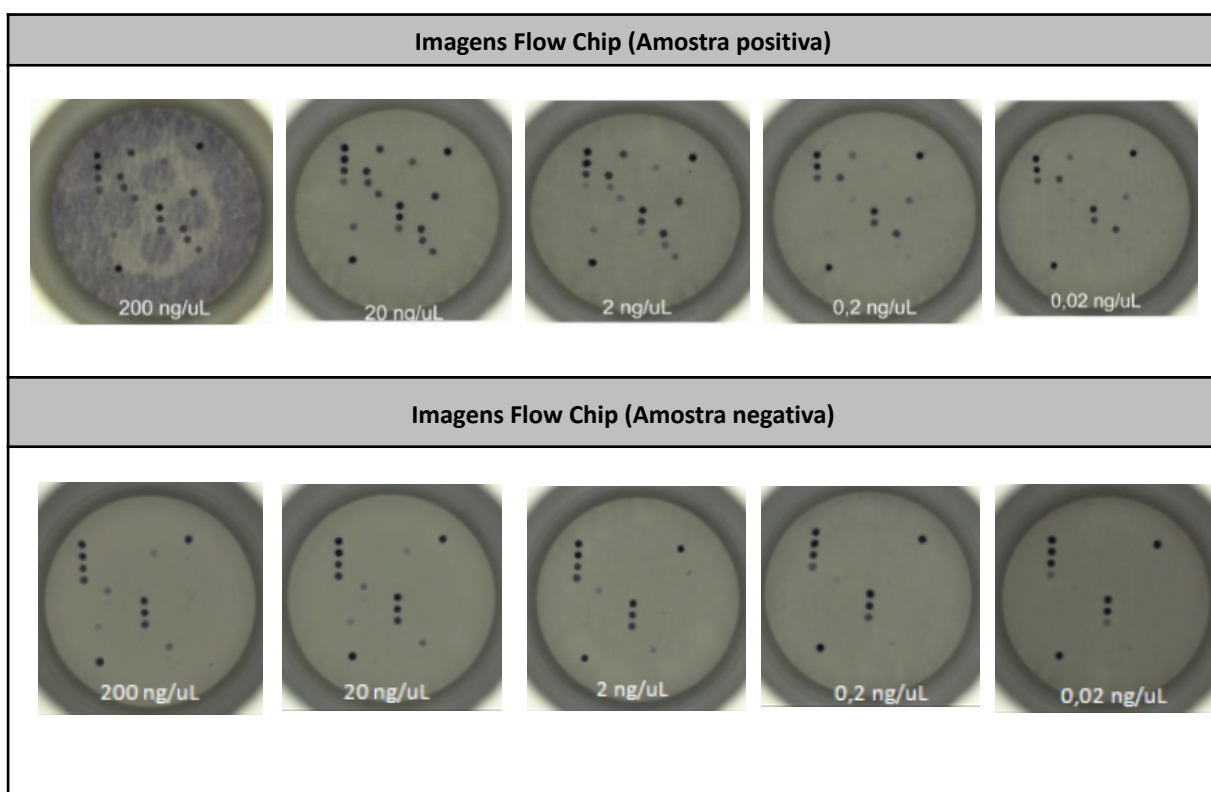


Figura 3: Resultados da intensidade da reação colorimétrica imunoenzimática de cinco diferentes concentrações de DNA em amostra positiva e negativa para determinação ótima de quantidade de DNA.

5.2.3 Resultados dos testes de repetibilidade analítico

A repetibilidade dos microrganismos *S. pneumoniae*, *E. faecium*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *C. albicans* e *S. maltophilia* foram avaliados com a diluição do padrão sintético em DNA positivo para *Streptococcus spp* e os outros

alvos foram avaliados com a diluição do padrão sintético em DNA negativo para qualquer microrganismo presente no painel. As amostras de *S. aureus* e *L. monocytogenes* foram avaliadas pelas concentrações obtidas nos testes das determinações de limite inferior de detecção, após aumento de 3 vezes da determinação inicial, referenciada pelo fabricante.

Foi observado assimetria de valores para alguns alvos, contudo, por se tratar de um método qualitativo a avaliação dos testes de repetibilidade, utilizando-se os valores da intensidade da reação colorimétrica imunoenzimática (Intensidade de cinza) de três réplicas de cada microrganismo demonstrou repetibilidade de 100%, conforme ilustrado no Figura 4. Não foram observados *outliers* ou valores estatisticamente diferentes ($P < 0,05$) para os testes de repetibilidade dos alvos analisados.

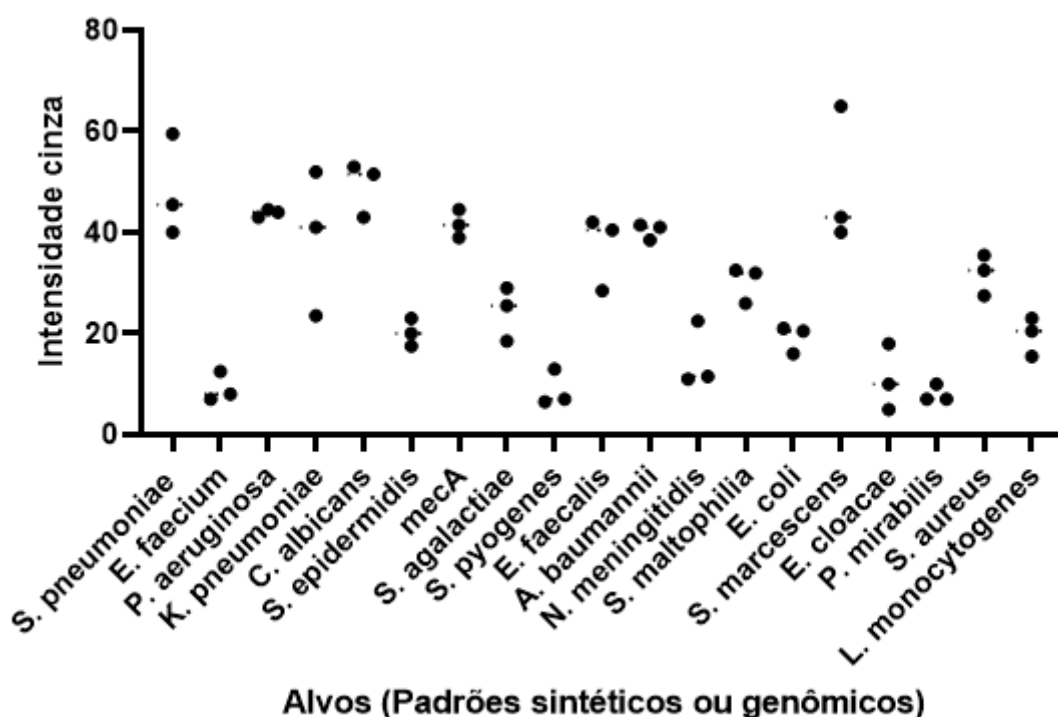


Figura 4: Resultados da intensidade da reação colorimétrica imunoenzimática dos alvos para determinação dos testes de repetibilidade analítica.

5.2.4 Análise do teste de precisão (repetibilidade e reprodutibilidade)

A avaliação do teste de precisão, utilizando-se os valores da intensidade da reação colorimétrica imunoenzimática de doze réplicas de uma amostra positiva para os microrganismos *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*, e os genes de resistência *vanA* e *KPC*, demonstrou uma reprodutibilidade de 100% e repetibilidade de 100%, conforme ilustrado nas Figuras 5 e 6. Houve apenas um *outlier*, presente na avaliação da sonda controle de Hibridização (B) ($P < 0,05$), os dados foram excluídos da análise.

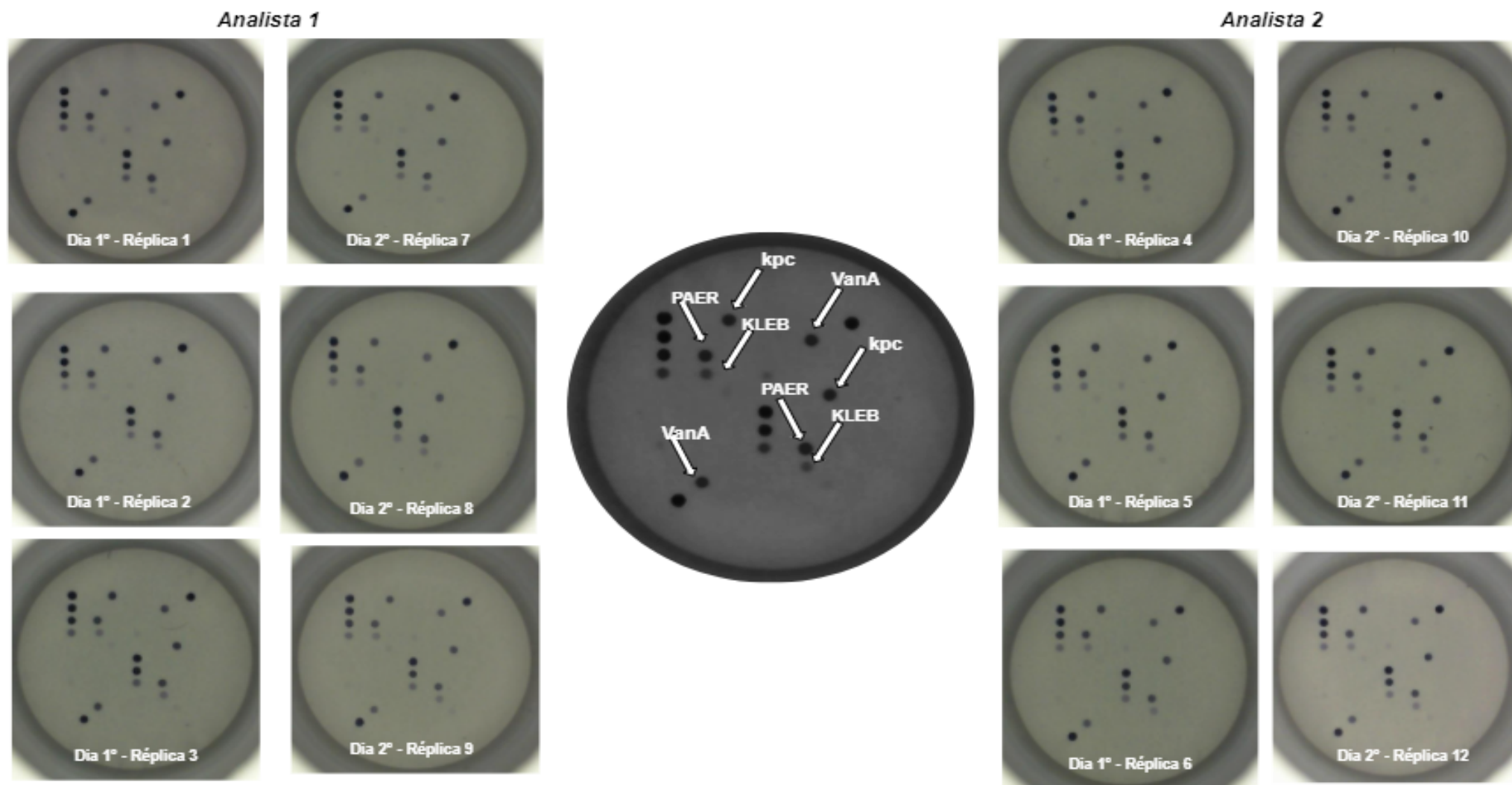


Figura 5 : Resultados visuais das seis replicatas analisadas pelos dois analistas. PAER (*Pseudomonas aeruginosa*) KLEB (*Klebsiella pneumoniae*) KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*) VanA (Gene de resistência à vancomicina)

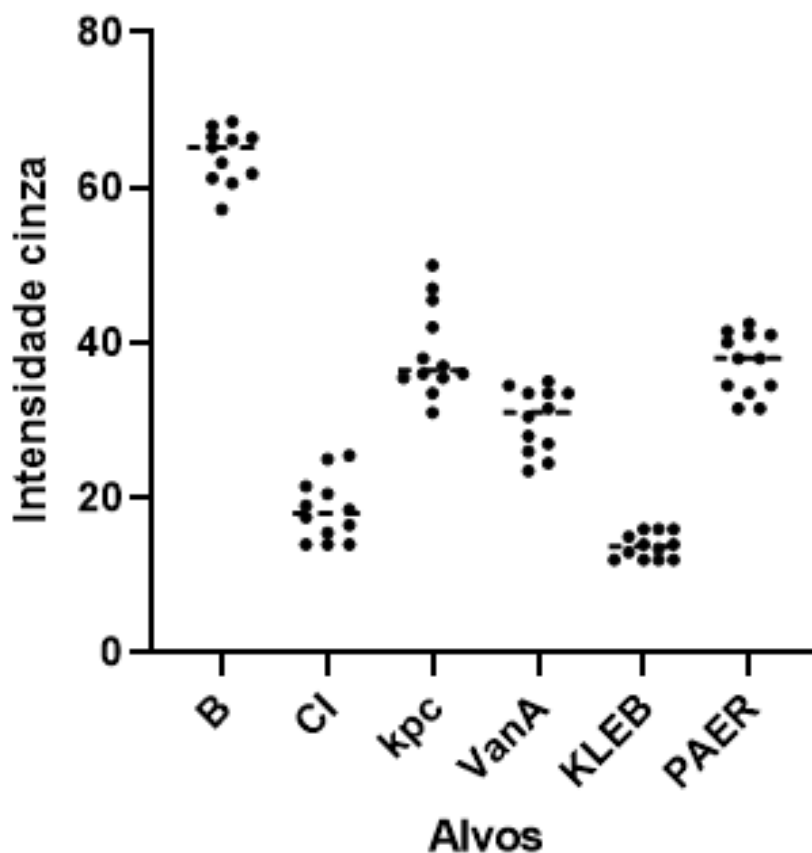


Figura 6 : Valores da intensidade da reação colorimétrica imunoenzimática dos testes de repetibilidade e reprodutibilidade dos controle de Hibridização (B), controle de amplificação exógeno (CI), gene KPC (kpc), gene VanA (VanA), *Klebsiella pneumoniae* (KLEB) e *Pseudomonas aeruginosa* (PAER)

5.3 Análise do resultados clínicos

5.3.1 Análise do resultado microbiológico

Todos os pacientes aceitos no estudo foram avaliados pelos métodos da microbiologia convencional como parte da rotina do hospital Felício Rocho. A rotina para identificação dos microrganismos, assim como de alguns testes de sensibilidade aos antimicrobianos, padronizada pelo hospital, consiste na identificação automatizada pelo VITEK® 2 Compact (BioMérieux Brasil, Rio de Janeiro, Brasil). A confirmação das resistências são realizadas por disco difusão, tiras de gradiente de concentração ou microdiluição em caldo de acordo com o antimicrobiano em avaliação, seguindo as normas de interpretação do BrCAST,

versão vigente na época da análise. O tempo de liberação dos resultados de identificação fenotípicas e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos das culturas microbiológicas variaram de 48 a 215,42 horas (Média de $92,28 \pm 10,33$ horas).

Os resultados do cultivo microbiológico da matriz respiratória foram registrados em prontuários dos respectivos pacientes e recuperados para análise deste estudo conforme demonstrado na tabela 6 e 10. No total foram isolados 47 microrganismos, sendo *Klebsiella pneumoniae* o mais prevalente dos isolados clínicos (27,69%), seguido de *Pseudomonas aeruginosa* (23,43%), *Staphylococcus aureus* (12,78%) e *Acinetobacter baumannii* (8,52%). Não houve crescimento em 32,07% das culturas microbiológicas.

Tabela 6 : Resultados da análise da microbiologia convencional.

Microorganismo	Nº de isolados	Porcentagem
<i>Staphylococcus aureus</i>	6	12,78%
<i>Streptococcus spp.</i>	1	2,13%
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1	2,13%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11	23,43%
<i>Acinetobacter baumannii</i>	4	8,52%
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	2,13%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13	27,69%
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	1	2,13%
<i>Corynebacterium accolens</i>	1	2,13%
<i>Candida albicans</i>	2	4,26%
<i>Candida tropicalis</i>	3	6,39%
<i>Enterobacter cloacae</i>	3	6,39%
Total	47	67,93%

5.4 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos na microbiologia convencional

A maioria dos microrganismos isolados neste estudo apresentavam algum perfil de resistência (66,66%), principalmente os isolados de *Klebsiella pneumoniae*

(92,30%) e *Acinetobacter baumannii* (100%). Dentre estes, os principais antimicrobianos cujas resistências foram detectadas são os carbapenêmicos Imipenem e Meropenem, as cefalosporinas de 3º geração e penicilinas como Cefotaxima, Ceftriaxona e Ampicilina. Os dados são demonstrados na tabela 10.

5.5 Análise do resultado do painel flow chip

Os pacientes aceitos no estudo foram avaliados pelo método flow chip, como parte da adaptação do painel molecular para diagnóstico etiológico de pneumonia, a rotina molecular foi realizada pelo laboratório Símile Medicina diagnóstica. Os resultados do painel molecular foram arquivados no sistema de gestão do laboratório e recuperados para análise deste estudo conforme demonstrado na Tabela 7. O tempo de liberação dos resultados de identificação genotípica bem como dos principais marcadores de resistência no painel *flow chip* (PCR) variou entre 4,92 a 44,62 horas (Média de $7,1 \pm 8,17$ horas), representando uma redução média de mais de 85 horas em relação ao tempo de obtenção de resultado pela microbiologia clássica.

No total foram detectados 115 microrganismos, sendo *Streptococcus spp.* o mais prevalente nas amostras analisadas (17,39%), seguido de *Pseudomonas aeruginosa* (15,65%), *Klebsiella pneumoniae* (14,78%), *Staphylococcus spp* (13,91%) e a família *Enterobacteriaceae* (12,17%). Não houve detecção de nenhum microrganismo em 13,20% das amostras clínicas

Tabela 7 : Resultado microbiológico da análise do Flow chip (PCR)

Microorganismo	Nº de isolados	Porcentagem
<i>Staphylococcus aureus</i>	6	5,21%
<i>Staphylococcus spp</i>	16	13,91%
<i>Streptococcus spp.</i>	20	17,39%
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2	1,73%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18	15,65%
<i>Acinetobacter baumannii</i>	4	3,47%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	17	14,78%

<i>Candida albicans</i>	12	10,43%
<i>Candida spp</i>	6	5,21%
<i>Enterobacteriaceae</i>	14	12,17%
Não detectado	7	13,20%

Em uma análise geral, a maioria das amostras positivas apresentaram detecções polimicrobianas (60,86%). O perfil polimicrobiano mais frequente, encontrado neste estudo foi de *Pseudomonas aeruginosa* + *Klebsiella pneumoniae* com outros microrganismos (21,4%) conforme mostrado na figura 7. Não foi observado um perfil estatisticamente predominante, contudo os microrganismos *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* foram observados em 32,1% das detecções polimicrobianas.

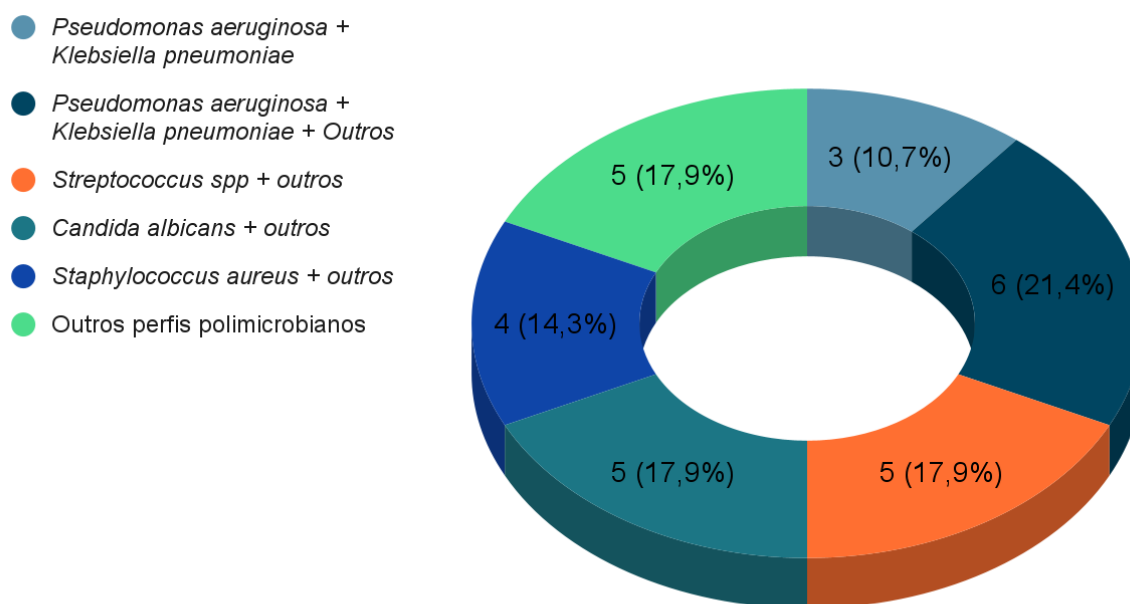


Figura 7: Perfis de detecção polimicrobiana no painel flow chip.

5.6 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos no painel flow chip

A maioria das amostras clínicas avaliadas neste estudo, por método molecular, apresentavam algum marcador de resistência (66,04%), principalmente amostras positivas para *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. Contudo, devido a identificação polimicrobiana da maioria das amostras (60,86%), não foi possível correlacionar o marcador de resistência ao microrganismo detectado. Dentre estes, os principais marcadores de resistência

identificados foram os genes KPC (25,35%), MecA (16,90%), blaSHV (14,08%) e blaCTX-M (12,67%). Não houve detecção de nenhum marcador de resistência em 33,96% das amostras clínicas.

Tabela 8 : Resultado da análise dos marcadores de resistência no painel flow chip

Gene de resistência	Nº de gene identificado	Porcentagem
<i>MecA</i>	12	16,90%
<i>VanA</i>	7	9,85%
<i>VanB</i>	0	0%
<i>KPC</i>	18	25,35%
<i>sme</i>	0	0%
<i>nmc/imi</i>	0	0%
<i>blaSHV</i>	10	14,08%
<i>blaCTX-M</i>	9	12,67%
<i>GES</i>	1	1,40%
<i>vim</i>	0	0%
<i>gim</i>	0	0%
<i>spm</i>	0	0%
<i>ndm</i>	4	5,63%
<i>sim</i>	0	0%
<i>IMP3</i>	0	0%
<i>Oxa 23</i>	5	7,04%
<i>Oxa 24</i>	0	0%
<i>Oxa 48</i>	0	0%
<i>Oxa 51</i>	5	7,04%
<i>Oxa 58</i>	0	0%
Total	71	66,04%
<i>Não detectado</i>	18	33,96%

5.7 Análise do teste sensibilidade e especificidade clínica

Para avaliação dos estudos de desempenho clínico, foram analisadas 53 amostras clínicas proveniente de pacientes com suspeita de pneumonia, sendo 36 casos positivos e 17 casos negativos confirmados pela cultura microbiológica convencional. Os resultados da cultura foram confrontados com os resultados do flow chip e os resultados para cada amostra estão descritos nas Tabelas 9 e 10. Esses resultados foram avaliados individualmente de acordo com a presença ou ausência de patógenos e microrganismos da microbiota indígena para avaliação de resultados negativo verdadeiro (NV), positivo falso (PF), positivo verdadeiro (PV) e negativo falso (NF). Por definição, foram considerados sugestivamente alvos colonizantes aqueles que apresentavam *cutoff* (intensidade de cinza) inferior a 35, exceto o alvo *Streptococcus spp.*, que apresentou intensidade superior em alguns casos, conforme demonstrado na tabela 10, este microrganismo foi considerado como colonizante em todas as amostras analisadas. Os resultados demonstraram 100% de concordância na especificidade dos alvos, exceto para os microrganismos *Streptococcus pneumoniae* (98,18%) e *Candida albicans* (98,11%). A sensibilidade para os patógenos testados foi de 100%. Uma limitação deste estudo foi a falta de técnicas complementares de identificação molecular, para confirmação dos resultados discordantes.

Tabela 9 : Avaliação da sensibilidade e especificidade clínica. NT (Não testado), Negativo verdadeiro (NV), Positivo falso (PF), Positivo verdadeiro (PV) e Negativo falso (NF)

Microorganismo	NV	PF	PV	NF	Especificidade	Sensibilidade
<i>Staphylococcus Coagulase-Negative</i>	53	0	0	0	100%	NT
<i>Staphylococcus aureus</i>	47	0	6	0	100%	100%
<i>Staphylococcus spp</i>	46	0	7	0	100%	100%
<i>Streptococcus spp.</i>	52	0	1	0	100%	100%
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	51	1	1	0	98,18%	100%
<i>Streptococcus agalactiae</i>	53	0	0	0	100%	NT
<i>Streptococcus pyogenes</i>	53	0	0	0	100%	NT

<i>Listeria monocytogenes</i>	53	0	0	0	100%	NT
<i>Enterococcus spp.</i>	53	0	0	0	100%	NT
<i>Streptococcus agalactiae</i>	53	0	0	0	100%	NT
<i>Streptococcus pyogenes</i>	53	0	0	0	100%	NT
<i>Listeria monocytogenes</i>	53	0	0	0	100%	NT
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	45	0	8	0	100%	100%
<i>Acinetobacter baumannii</i>	49	0	4	0	100%	100%
<i>Neisseria meningitidis</i>	53	0	0	0	100%	NT
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	53	0	0	1	100%	NT
<i>Escherichia coli</i>	53	0	0	0	100%	NT
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	40	0	13	0	100%	100%
<i>Serratia marcescens</i>	53	0	0	0	100%	NT
<i>Enterobacteriaceae</i>	43	0	10	0	100%	100%
<i>Proteus mirabilis</i>	53	0	0	0	100%	NT
<i>Morganella morganii</i>	53	0	0	0	100%	NT
<i>Candida albicans</i>	49	1	3	0	98,11%	NT
<i>Candida spp.</i>	52	0	1	0	100%	100%
Geral	-	-	-	-	99,84%	100%

Os resultados demonstraram 100% de sensibilidade do painel flow chip para todos os tipos de matrizes respiratórias avaliadas neste estudo. Porém há uma menor especificidade para amostras de lavado broncoalveolar (92,3%) e Mini lavado broncoalveolar (88,88%). Os dados são mostrados na figura 8.

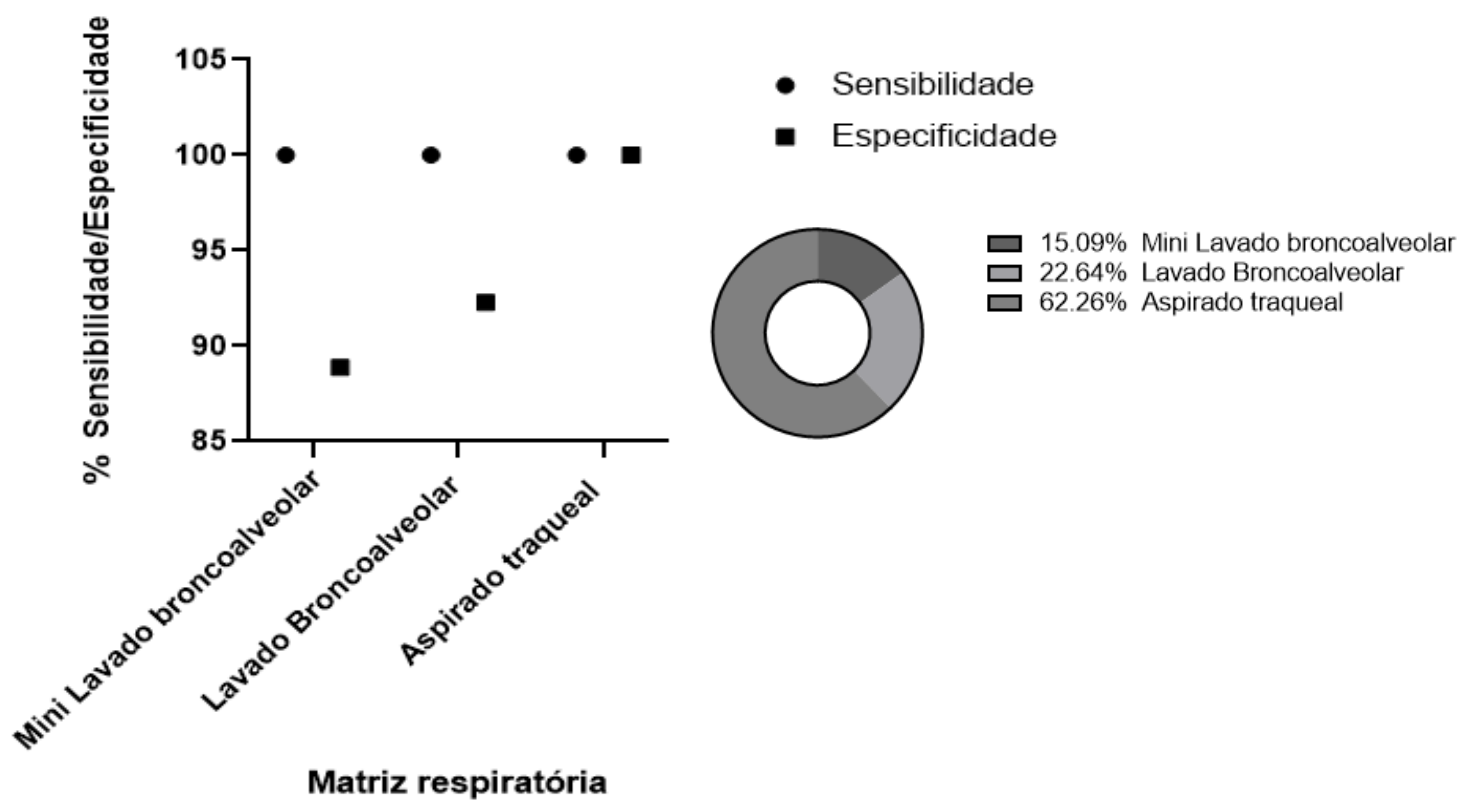


Figura 8: Perfil de sensibilidade e especificidade por matriz respiratória

Tabela 10: Resultado geral da análise de comparabilidade metodológica flow chip PCR versus microbiologia convencional. Masculino (M), Feminino (F), Lavado Broncoalveolar (BAL), Mini lavado broncoalveolar (Mini-BAL), Aspirado traqueal (Aspirado), Não informado (N/I).

Nº amostra	Idade	Sexo	Tipo de amostra	PCR flow chip - Hibridização		Cultura microbiológica clássica	
				Microrganismo	Marcadores de resistência	Microrganismos	Antibiograma
1	93	M	Aspirado	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC, SHV	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Multissensível) e <i>Klebsiella pneumoniae</i> (Resistente a Ampicilina , Ampicilina/Sulbactam , Cefepime, Ceftazidima, Ceftriaxona, Gentamicina , imipenem, Piperacilina/Tazobactam)
2	80	M	Aspirado	Enterobacteriaceae (23), <i>Candida albicans</i> (16), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (50), <i>Klebsiella pneumoniae</i> (9), <i>Streptococcus</i> spp. (15)	SHV, OXA23_like, OXA51_like	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Multissensível
3	85	M	BAL	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (12) e <i>Streptococcus</i> spp. (42)	Não detectado.	Não houve crescimento	Multissensível
4	84	M	Aspirado	<i>Candida</i> spp.(6), Enterobacteriaceae (35), <i>Candida albicans</i> (10), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (56), <i>Klebsiella pneumoniae</i> (40), <i>Streptococcus</i> spp. (12)	KPC, SHV, CTX-M	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Resistente a Imipenem e Meropenem) <i>Klebsiella pneumoniae</i> (Resistente a Ampicilina, Ampicilina/Sulbactam, Cefepime, Ceftazidime, Ceftriaxona, Gentamicina , Imipenem, Piperacilina/Tazobactam)
5	70	M	Aspirado	<i>Staphylococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp.	mecA	Não houve crescimento	-
6	70	M	BAL	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Streptococcus</i> spp.	não detectada	<i>Streptococcus parasanguinis</i> e <i>Corynebacterium accolens</i>	Multissensível
7	71	M	BAL	<i>Streptococcus</i> spp.	não detectada	<i>Candida tropicalis</i>	Multissensível

8	84	F	Aspirado	Klebsiella pneumoniae (5), Streptococcus spp. (16)	SHV	Não houve crescimento	-
9	84	M	Aspirado	Pseudomonas aeruginosa	Não detectado	Enterobacter cloacae	Multissensível
10	72	M	Aspirado	Staphylococcus spp. (33), Staphylococcus aureus (35), Streptococcus spp. (21)	Não detectado	Staphylococcus aureus	Multissensível
11	75	F	BAL	Pseudomonas aeruginosa (43)	Não detectado	Pseudomonas aeruginosa	Multissensível
12	97	M	Aspirado	Staphylococcus aureus (45), Pseudomonas aeruginosa (9), Klebsiella pneumoniae (12) Streptococcus spp. (3)	vanA; KPC	Staphylococcus aureus	Multissensível
13	91	M	Aspirado	Pseudomonas aeruginosa (42) , Klebsiella pneumoniae (49)	VanA, KPC, SHV	Pseudomonas aeruginosa e Klebsiella pneumoniae	Pseudomonas aeruginosa (Resistente a Imipenem e Meropenem) Klebsiella pneumoniae (Resistente a Ampicilina, Ampicilina/Sulbactam, Cefepime, Ceftazidima, Ceftriaxona, Gentamicina , Imipenem, Piperacilina/Tazobactam)
14	91	M	Aspirado	Staphylococcus spp. (5), Staphylococcus aureus (46), Pseudomonas aeruginosa (41), Streptococcus spp. (10)	mecA	Staphylococcus aureus	Resistente a Benzilpenicilina, Clindamicina, Eritromicina , Levofloxacina, Oxacilina
15	70	M	escarro	Staphylococcus spp., Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae	mecA, KPC	Não houve crescimento	-
16	44	M	Mini-BAL	Staphylococcus spp. , Staphylococcus aureus, Enterobacteriaceae, Streptococcus spp.	Não detectado	Staphylococcus aureus	Resistente a Benzilpenicilina, Clindamicina, Eritromicina , Levofloxacina, Oxacilina
17	44	F	Mini-BAL	Não detectado	mecA	Enterobacter Cloacae	Resistente a Cefoxitina; Cefuroxima; Cefuroxima Axetil
18	21	M	Aspirado	Não detectado	mecA	Não houve crescimento	-
19	57	M	BAL	Pseudomonas aeruginosa , Candida albicans, Staphylococcus spp.	mecA	Pseudomonas aeruginosa	N/I

20	62	F	BAL	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Resistente a Ampicilina, Ampicilina/Sulbactam, Cefepime, Ceftazidima, Ceftriaxona, Gentamicina , Imipenem, Piperacilina/Tazobactam
21	84	M	Aspirado	<i>Streptococcus</i> spp.	Não detectado	Não houve crescimento	-
22	71	M	Aspirado	Enterobacteriaceae, <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Streptococcus</i> spp.	KPC, SHV e CTX-M	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Resistente a Ampicilina, Ampicilina/Sulbactam, Cefepime, Ceftazidima, Ceftriaxona, Gentamicina , Imipenem, Piperacilina/Tazobactam
23	73	M	Aspirado	<i>Candida</i> spp. <i>Candida albicans</i>	Não detectado	<i>Candida albicans</i>	Multissensível
24	82	M	Aspirado	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Staphylococcus</i> spp.	<i>mecA</i> , <i>vanA</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Multissensível
25	57	F	Aspirado	<i>Streptococcus</i> spp. e <i>Staphylococcus</i> spp	<i>mecA</i>	Não houve crescimento	-
26	55	M	Aspirado	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	KPC	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Resistente à Ciprofloxacina, Imipenem, Meropenem e Piperacilina/Tazobactam
27	32	M	escarro	Enterobacteriaceae, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Streptococcus</i> spp.	CTX-M	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Multissensível
28	73	F	BAL	Enterobacteriaceae, <i>Streptococcus</i> spp.	Não detectado	Não houve crescimento	-
29	47	M	Mini-BAL	<i>Candida albicans</i> , <i>Staphylococcus</i> spp.	<i>mecA</i>	Não houve crescimento	-
30	41	M	Mini-BAL	<i>Streptococcus</i> spp.	Não detectado	Não houve crescimento	-
31	62	M	BAL	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>mecA</i> , <i>vanA</i> , KPC, OXA 51 like	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Resistente a Cefepima, Ceftriaxona, Ciprofloxacina, Gentamicina, Meropenem , Piperacilina/Tazobactam e Trimetoprim/Sulfametoxazol
32	80	M	Mini-BAL	<i>Staphylococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp., <i>Candida albicans</i>	<i>mecA</i>	<i>Candida tropicalis</i>	Multissensível

33	41	M	Mini-BAL	Klebsiella pneumoniae, Enterobacteriaceae	CTX-M, NDM	Enterobacter cloacae complex, Klebsiella pneumoniae	Enterobacter cloacae complex (Resistente a Cefepima, Cefoxitina, Ceftazidima, Ceftriaxona, Cefuroxima, Cefuroxima Axetil, Ciprofloxacina, Ertapenem, Gentamicina, Imipenem, Meropenem, Piperacilina/Tazobactam) Klebsiella pneumoniae (Ampicilina, Ampicilina/Sulbactam, Cefepima, Cefoxitina, Ceftazidima, Ceftriaxona, Cefuroxima, Cefuroxima Axetil, Ciprofloxacina R >=4)
34	65	F	Mini-BAL	Não detectado	vanA	Não houve crescimento	-
35	57	M	BAL	Staphylococcus spp., Staphylococcus aureus	mecA	Staphylococcus aureus	Resistente a Benzilpenicilina, Clindamicina, Eritromicina , Levofloxacina, Oxacilina
36	16	M	BAL	Staphylococcus spp., Staphylococcus aureus, Streptococcus spp. , Candida spp.	VanA , KPC	Staphylococcus aureus	N/I
37	82	M	BAL	Não detectado	Não detectado	não houve crescimento	-
38	58	M	BAL	Acinetobacter baumannii	OXA23_like, OXA51_like	Acinetobacter baumannii	Resistente a Cefepima, Ceftazidima, Ceftriaxona, Ciprofloxacina, Gentamicina, Meropenem , Piperacilina/Tazobactam, Amicacina e Polimixina B
39	51	F	Mini-BAL	Não detectado	KPC	não houve crescimento	-
40	68	M	Aspirado	Enterobacteriaceae; Pseudomonas aeruginosa; Klebsiella pneumoniae; Streptococcus spp.	KPC, SHV; GES	Klebsiella pneumoniae, Candida tropicalis , Stenotrophomonas maltophilia	Klebsiella pneumoniae (Resistente a Ampicilina, Ampicilina/Sulbactam, Cefepima, Ceftazidima, Ceftriaxona, Ertapenem , Imipenem, Meropenem) candida tropicalis (Multissensível), Stenotrophomonas maltophilia (Multissensível)
41	55	M	Aspirado	Enterobacteriaceae (31), Klebsiella pneumoniae (64), Streptococcus spp. (38)	KPC, CTX-M, NDM, OXA23_like, OXA51_like	Klebsiella pneumoniae	Resistente a Ampicilina, Ampicilina/Sulbactam, Cefepima, Ceftazidima, Ceftriaxona, Gentamicina Imipenem, Meropenem, Piperacilina/Tazobactam , Polimixina B
42	70	F	Aspirado	Pseudomonas aeruginosa (62)	Não detectado	Pseudomonas aeruginosa	Resistente a Amicacina, Cefepima, Ceftazidima, Ciprofloxacino, Gentamicina, Meropenem

43	57	M	Aspirado	Enterobacteriaceae (32), Candida albicans (8), Klebsiella pneumoniae (58,5)	KPC, SHV, CTX-M	Klebsiella pneumoniae	Resistente a Ampicilina, Ampicilina/Sulbactam, Cefepima, Ceftazidima, Ceftriaxona, Gentamicina, Meropenem, Piperacilina/Tazobactam , Polimixina B, Sulfametoxazol/trimetoprima
44	49	M	Aspirado	Enterobacteriaceae (34,5) , Klebsiella pneumoniae (81,5)	VanA, KPC, CTX-M, NDM, SHV	Klebsiella pneumoniae	Resistente a Ampicilina, Ampicilina/Sulbactam, Cefepima, Ceftazidima, Ceftriaxona, Doxiciclina, Ciprofloxacino, Imipenem, Meropenem , Piperacilina/Tazobactam e Polimixina B
45	79	M	Aspirado	Acinetobacter baumannii	OXA23_like, OXA51_like	Acinetobacter baumannii	Resistente à Ciprofloxacina, Doxiciclina, Gentamicina, Meropenem , sulfametoxazol/trimetoprima
46	48	M	Aspirado	Enterobacteriaceae (22) , Klebsiella pneumoniae (68,5)	KPC ; SHV ; CTX-M; NDM	Klebsiella pneumoniae	Resistente a Ampicilina, Ampicilina/Sulbactam, Cefepima, Ceftazidima, Ceftriaxona, Ciprofloxacina, Doxiciclina, Ertapenem Gentamicina, Meropenem, Piperacilina/Tazobactam , Polimixina B
47	51	F	Aspirado	Candida spp (9,5), Acinetobacter baumannii (49), Candida albicans (11), Klebsiella pneumoniae (39)	KPC; SHV; CTX-M; OXA23	Klebsiella pneumoniae , Acinetobacter baumannii	Resistente a Ampicilina, Ampicilina/Sulbactam, Cefepima, Ceftazidima, Ceftriaxona, Ciprofloxacina, Doxiciclina , Imipenem, Meropenem , Piperacilina/Tazobactam, Polimixina B
48	36	M	Aspirado	Enterobacteriaceae (15,5); Klebsiella pneumoniae (39)	KPC	Klebsiella pneumoniae	Resistente a Ampicilina, Ampicilina/Sulbactam, Cefepima, Ceftazidima, Ceftriaxona, Ciprofloxacina, Doxiciclina, Imipenem, Meropenem , Piperacilina/Tazobactam, Polimixina B
49	<u>53</u>	<u>F</u>	Aspirado	Não detectado	Não detectado	Não houve crescimento	-
50	<u>80</u>	<u>M</u>	Aspirado	Streptococcus pneumoniae (67); Candida spp (10,5), Candida albicans (15), Pseudomonas aeruginosa (43,5) , Streptococcus spp. (32,5)	Não detectado	Streptococcus pneumoniae	Multissensível
51	<u>40</u>	<u>M</u>	Aspirado	Streptococcus spp	Não detectado	Não houve crescimento	-

52	<u>47</u>	F	Aspirado	Candida spp (11,5), Candida albicans (24)	Não detectado	Não houve crescimento	-
53	<u>84</u>	F	Aspirado	Não detectado	Não detectado	Não houve crescimento	-

6. DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo avaliar a adaptação de um painel genético molecular bacteriano e os principais genes codificadores de resistência, antes utilizado para o diagnóstico de agentes etiológicos de sepse em amostras de hemocultura positiva, swab retal ou colônia isolada. A adaptação consiste na utilização do painel para diagnóstico rápido de microrganismos causadores de pneumonia, principalmente as pneumonias nosocomiais ou associados a ventilação mecânica, além dos principais marcadores de resistência em amostras de mini lavado broncoalveolar, lavado broncoalveolar e/ou aspirado traqueal. Os dados obtidos demonstram uma alta taxa de pneumonia confirmada (67,92%), principalmente em pacientes do sexo masculino (75,47%) e idade média de $63,94 \pm 18,62$ anos. Resultados semelhantes são observados em estudos realizados por SOUZA (2012), WEBBER *et al.*, (2020) e KYRIAZOPOULOU *et al.*, (2021). O índice de mortalidade deste estudo foi baixo (3,77%), entretanto, a maioria dos dados sobre a mortalidade dos pacientes estavam inacessíveis ou não foram disponibilizados (49,05%). Isso pode ter contribuído para a aparente discordância em relação a outros estudos que avaliaram mortalidade em paciente com pneumonia (BORK *et al.*, 2015; MOREIRA, 2012).

Quando comparado ao tempo de resposta, a identificação fenotípicas e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos das culturas microbiológicas demoram em média 92,28 horas versus uma média de 7,1 horas na identificação genotípica e os principais marcadores de resistência no painel flow chip (PCR). Os resultados demonstram que o painel flow chip foi, em média, 85,1 horas mais rápido em relação a microbiologia convencional. Resultados semelhantes quanto a esta variação de tempo também são encontrados por WEBBER *et al.*, (2020), que utilizando de metodologia de diagnóstico rápido, o Painel de pneumonia BioFire FilmArray, demonstraram um tempo de retorno dos resultados 42,2 horas mais rápido do que a cultura microbiológica convencional. JAMAL *et al* (2014), utilizando um sistema semelhante, o ensaio de pneumonia Unyvero baseado em PCR, também encontrou uma variação de 44 a 92 horas em relação à cultura convencional. Estudos demonstram que o tempo de resposta rápido permite a redução do uso de antimicrobianos de amplo espectro e auxilia no controle de problemas relacionados à seleção de bactérias resistentes, provocado

principalmente por hospitais, devido ao uso excessivo e indevido de antibióticos, além dos gastos desnecessários intrínsecos a antibioticoterapia (VARDAKAS *et al.*, 2015; BARTLETT, GILBERT e SPELLBERG, 2013; CANTÓN *et al.*, 2013).

Em relação aos resultados da cultura microbiológica convencional, foram isolados 47 microrganismos, sendo *Klebsiella pneumoniae* o mais prevalente dos isolados clínicos (27,69%), seguido de *Pseudomonas aeruginosa* (23,43%), *Staphylococcus aureus* (12,78%) e *Acinetobacter baumannii* (8,52%). Outros autores também relatam a frequência destes microrganismos como agentes etiológicos de pneumonia no Brasil (COSTA *et al.*, 2016), Bélgica (DAMAS *et al.*, 2022), Estados Unidos da América (FRIDKIN, 2001) e multirresistentes na Inglaterra (BASSETTI *et al.*, 2016).

Os resultados do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos, obtidos através da microbiologia convencional neste estudo, apresentavam algum perfil de resistência (66,66% dos casos positivos), principalmente os isolados de *Klebsiella pneumoniae* (92,30%) e *Acinetobacter baumannii* (100%). Dentre estes, os principais antimicrobianos cuja resistência foi detectada são os carbapenêmicos como Imipenem e Meropenem, cefalosporinas de 3º geração e penicilinas como Ceftazidima, Ceftriaxona e Ampicilina. Estudos vêm demonstrando que este perfil de resistência em *Klebsiella pneumoniae*, aos carbapenêmicos e às cefalosporinas de 3º geração, tem se tornando ubíquo, representando um risco crítico, e obrigando urgentemente o corpo clínico a buscar novos tratamentos (SHRIVASTAVA, *et al.*, 2018). Conseqüentemente, este fato, eleva as taxas de morbimortalidade, tornando-se um grande desafio aos sistemas de saúde pública no que se refere a Infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) (OLIVEIRA *et al.*, 2016). A resistência de *A. baumannii* aos carbapenêmicos também se tornou um desafio terapêutico na atualidade. Infecções causadas por este microrganismo, principalmente relacionadas ao trato respiratório, em pneumonias associadas à ventilação mecânica, têm apresentado altas taxas de mortalidade e aumento do tempo de permanência hospitalar (SOUDEIHA *et al.*, 2017). Em 2017, a Organização Mundial da Saúde classificou o *A. baumannii* como uma das espécies bacterianas multirresistentes que representam maior risco para a saúde humana (TALEBI *et al.*, 2019).

Os resultados microbiológicos de identificação obtidos através da tecnologia flow chip detectou 115 microrganismos, sendo *Streptococcus* spp. o mais prevalente dentre os microrganismos detectados (17,39%), seguido de *Pseudomonas aeruginosa* (15,65%), *Klebsiella pneumoniae* (14,78%) e *Staphylococcus* spp (13,91%). Em uma primeira análise, os resultados da cultura microbiológica convencional são discrepantes do painel bacteriano flow chip, principalmente no que tange o número total de microrganismos identificados e na frequência em que são apresentados. Contudo, ressaltamos que, por se tratar de um ensaio de diagnóstico molecular, e apresentar maior sensibilidade em comparação com a cultura microbiológica convencional para detecção de microrganismos potencialmente patogênicos em amostra respiratórias, o ensaio molecular pode fornecer um diagnóstico positivo em uma determinada população sem necessariamente caracterizar um agente patogênico causador de determinada infecção/condição.

A discrepância observada entre o ensaio molecular e a bacteriologia convencional pode ser avaliada pelos seguintes motivos: pode haver contaminação da amostra no momento da coleta com microrganismos da pele e/ou orofaringe ou por microrganismos da microbiota indígena do paciente; outra circunstância é a detecção de DNA, por parte do ensaio molecular, de bactérias não vivas, justificando a ausência de crescimento na cultura bacteriológica convencional. Os métodos moleculares têm alta sensibilidade e são capazes de detectar pequenas quantidades de DNA do microrganismo, ainda levando em consideração que o trato respiratório não é necessariamente estéril mesmo em indivíduos sem infecção clínica aguda verdadeira (SCHULTE *et al.*, 2014). Este fato, corrobora a divergência de resultados negativos na cultura convencional (32,07%) versus o painel molecular (13,20%). Pode-se postular que o uso prévio de antibióticos pode dificultar o crescimento bacteriano em uma cultura bacteriológica convencional, ao passo que, nesses casos, o ensaio molecular apresenta uma vantagem aparente. A ausência de crescimento bacteriano não pode excluir a presença de uma infecção bacteriana, pois, em indivíduos em uso de antimicrobiano, o crescimento pode estar ausente mesmo na infecção verdadeira (JAHN *et al.*, 2015).

O maior desafio apresentado neste estudo é a diferenciação entre o que é microbiota indígena e o que é o possível agente causador da condição pulmonar do paciente. Devido a alta sensibilidade da metodologia na biologia molecular,

microorganismos não identificados na cultura microbiológica convencional podem ser facilmente identificados nas técnicas de detecção de DNA (SCHULTE *et al.*, 2014). Pesquisas recentes descrevem os resultados de estudos do microbioma pulmonar que demonstram a singularidade do sistema respiratório, principalmente o sistema respiratório inferior. Os autores descrevem que há uma coexistência no microbioma saudável, apresentando baixa densidade de colônias, porém uma elevada diversidade de microrganismos, e que alguns estados patológicos podem levar ao processo de disbiose, com aumento na concentração de alguns gêneros bacterianos em detrimento de outros (WANG *et al.*, 2016; SCALES, 2015, ROGERS *et al.*, 2015; COSTA *et al.* 2018). Apesar de diferença entre estudos, os filos bacterianos mais comumente identificados são Proteobacteria, Firmicutes, e Bacteroidetes, destacando os gêneros *Streptococcus*, *Prevotella*, *Fusobacteria* e *Veillonella*, e em menor contribuição de potenciais patógenos os gêneros *Haemophilus* e *Neisseria*. Os estudos corroboram os resultados apresentados neste estudo quando relacionados ao diagnóstico via biologia molecular, onde demonstram prevalência na detecção de *Streptococcus* spp. Assim, pontos de cortes devem ser implementados para avaliação das amostras respiratórias e serem estabelecidos de acordo com a clínica e a relevância do microrganismo detectado para matriz respiratória em análise, visto que alguns serão categorizados como contaminação ou comensal.

ZAKHARKINA *et al.* (2017), em um estudo com 35 pacientes, sugeriram que a ventilação mecânica está mais associada ao processo de disbiose do sistema respiratório do que antimicrobianos de uso sistêmico. E que pacientes que desenvolvem a PAV, apresentam disbiose mais intensa do que aqueles que não a desenvolvem. A análise do microbioma pode também auxiliar no diagnóstico etiológico e na diferenciação entre pneumonia e colonização por um patógeno potencial. Apesar dos recentes achados, e das excitantes descobertas, um ceticismo deve ser colocado sobre as análises, pois existe um risco de ser feita uma série de associações especulativas entre a microbiota e estados de saúde e doença (COSTA *et al.*, 2018). Nestes casos, o julgamento clínico deve ser avaliado em conjunto para determinar os possíveis agentes causadores da doença (JANH *et al.*, 2015; BONAFEDE *et al.*, 2012).

Em uma análise geral, a maioria das amostras positivas apresentaram detecções polimicrobianas (60,86%). O perfil polimicrobiano mais frequente, encontrado neste estudo foi de *Pseudomonas aeruginosa* + *Klebsiella pneumoniae* associados com outros microrganismos (21,4%). Conforme relato em outros estudos, as taxas de infecções polimicrobianas variam amplamente, contudo, demonstram aumento em pacientes com síndromes respiratórias (CHASTRE e FAGON, 2002; AMERICAN THORACIC SOCIETY, 2005). Um estudo realizado por Almeida Júnior (2021), demonstrou uma frequência de 23.8% de infecções polimicrobianas, sendo 41.2% causada por bacilos Gram-negativos. Estas infecções polimicrobianas provenientes de amostras respiratórias são de difícil interpretação, principalmente quando relacionado com microrganismos comensais da orofaringe (estreptococos do grupo viridans, estafilococos coagulase-negativos, espécies de *Neisseria*), pois estes podem produzir infecções e serem importantes na análise de resultados em pacientes imunocomprometidos (TORRES *et al.*, 1989; AMERICAN THORACIC SOCIETY, 2005).

O estudo de marcadores de resistência no painel molecular demonstrou que 66,04% das amostras apresentavam algum tipo de marcador, principalmente as amostras positivas para *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*, valor muito próximo àquele obtido na metodologia convencional (66,6%). Contudo, devido a identificação polimicrobiana da maioria das amostras (60,86%), não foi possível correlacionar, com devida precisão, o marcador de resistência aos microrganismos identificados. Dentre estes, os principais marcadores de resistência identificados foram os genes *kpc* (25,35%), *MecA* (16,90%), *blaSHV* (14,08%) e *blaCTX-M* (12,67%). A vantagem da metodologia molecular flow chip em estudo é o amplo painel de determinantes de resistências genéticas para organismos Gram-negativos, incluindo a maioria das carbapenemases de interesse clínico, conforme citado anteriormente (GALIANA, *et al.*, 2017). Apesar de ser amplo, outros estudos que avaliaram marcadores de resistência corroboram a prevalência e detecção dos dados do presente estudo (CURETIS, 2018; WEBBER *et al.*, 2020). Apesar da detecção dos marcadores de resistência, outros fatores devem ser considerados, pois a resistência é um processo heterogêneo. Uma limitação inerente ao painel diagnóstico proposto é que a ausência da detecção de determinados marcadores não implica que o microrganismo identificado seja sensível a determinado antimicrobiano, uma vez que

outros mecanismos como bombas de efluxo e permeabilidade ao antibiótico estão envolvidos (GALIANA, *et al.*, 2017). Contudo, a detecção destes genes de resistência, em amostra respiratórias, em estágios iniciais de infecção é muito útil quando se trata de otimização do tratamento empírico de forma rápida ou iniciar um processo de adaptação da terapia antimicrobiana já em uso, consequentemente melhorando o manejo e a resposta clínica (AVDIC e CARROL, 2014)

Para avaliação dos estudos de desempenho clínico, foram analisadas 53 amostras clínicas provenientes de pacientes com suspeita de pneumonia, sendo 36 casos positivos e 17 casos negativos avaliados pela cultura microbiológica convencional. Os resultados da cultura foram confrontados com os resultados do teste com o flow chip e os casos foram avaliados individualmente de acordo com a presença ou ausência de microrganismos da microbiota indígena, de acordo com avaliação do *cutoff* para distinguir sugestivamente microbiota de patógeno, alterando de 4 para 35 o ponto de corte (em relação a intensidade de cinza), conforme discutido anteriormente para avaliação dos resultados,. Os resultados demonstraram 99,84% de concordância geral ou especificidade, consequentemente por causa dos microrganismos *Streptococcus pneumoniae* (98,18%) e *Candida albicans* (98,11%). A sensibilidade para os patógenos testados foi de 100%. Em um estudo realizado por CURETIS (2018), um painel aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 2018, para realização da detecção qualitativa de 19 alvos bacterianos e 10 marcadores de resistência em amostras de aspirados traqueais e lavado broncoalveolar, demonstraram uma sensibilidade ponderada geral de 92,5% e uma especificidade geral de 97,4% em comparação com as da cultura para identificação bacteriana. Já um estudo de um painel realizado por TISSARI *et al.*, (2010) a PCR em conjunto com ensaio *Prove-it Sepsis* baseado em microarrays foram utilizados para detecção de infecções da corrente sanguínea de pacientes sépticos com sensibilidade relatada de 95% e especificidade de 99%. Já o estudo realizado por GALIANA, *et al.* (2017), utilizando o mesmo painel em estudo, porém direcionado para amostras de hemocultura positiva, demonstraram uma concordância com os diagnóstico microbiológico de 96,2% em hemoculturas monomicrobianas e 89,1% em hemoculturas polimicrobianas, uma concordância geral de 92,6%. WEBBER e colaboradores (2020), em uma avaliação do painel *BioFire FilmArray Pneumonia*, que é capaz de detectar 18 alvos bacterianos, 8 alvos virais e 7 genes de resistência, mostraram uma forte correlação com os métodos convencionais para

detecção de alvos virais (99,2%) e bacterianos (96,8%). Um estudo realizado por JANH *et al.*, (2015) em amostras de Lavado broncoalveolar concluiu que o diagnóstico molecular rápido baseado em PCR e microarray oferece uma vantagem relativa às culturas convencionais para a detecção de bactérias potencialmente patogênicas em pacientes com pneumonia. Assim, os resultados obtidos nesse estudo são similares aos resultados encontrados em outros estudos propondo objetivos semelhantes.

Quando analisados os resultados por tipo de matriz respiratória, o estudo demonstrou 100% de sensibilidade no painel flow chip para todos os tipos de matriz respiratórias avaliadas. Porém há uma menor especificidade para amostras de lavado broncoalveolar (92,3%) e Mini lavado broncoalveolar (88,88%). Contudo, os dados obtidos neste estudo não são conclusivos para afirmar esta especificidade, visto que houve poucas amostras de ambas as matrizes, e houve divergência de apenas uma amostra para cada matriz. Estudos subsequentes são sugeridos para correta avaliação da especificidade. Alguns estudos corroboram a utilização destas matrizes, demonstrando forte correlação para isolar patógenos bacterianos e fúngicos (TASBAKAN *et al.*, 2011).

Em relação ao nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que objetiva avaliar o painel molecular flow chip em amostras respiratórias e os nossos resultados demonstraram excelente concordância no diagnóstico etiológico de pneumonia. Os resultados não foram significativamente diferentes, apesar da discordância de dois resultados envolvendo *Streptococcus pneumoniae* e *Candida albicans*. Embora os resultados obtidos neste estudo sejam promissores e a vantagem do tamanho do painel se sobressaia em relação a outros métodos semelhantes, mais estudos com um maior tamanho amostral e diferentes tipos de populações de pacientes devem ser realizados. As principais limitações do nosso estudo foram a falta de outros métodos moleculares para confirmação diagnóstica, o formato retrospectivo e desenho de centro de estudo único, o que reduz a generalização dos resultados conforme também descrito por WEBBER *et al.* (2020). Outra limitação importante é que, atualmente, o ensaio molecular do painel flow chip não inclui um painel bacteriano respiratório específico, mas sim um amplo painel séptico e, portanto, deve ser adaptado de acordo. Existem vários patógenos relevantes que não estão incluídos no painel de detecção, como *Haemophilus*

influenzae, *Mycoplasma pneumoniae* , *Legionella* spp. e *Bordetella pertussis* e, ao mesmo tempo, patógenos irrelevantes das vias respiratórias, tais como os estafilococos coagulase-negativos, estão incorporados no painel.

7. CONCLUSÃO

Neste estudo, o painel molecular bacteriano, utilizando-se da metodologia flow chip, apresentou boa concordância com a cultura microbiológica convencional. Os resultados demonstram boa repetibilidade, reprodutibilidade e alta precisão analítica e clínica em detectar microrganismos e marcadores de resistência em amostras de via aérea inferior relacionados à pneumonia. Este ensaio se mostrou promissor para futura implementação na rotina laboratorial, que auxiliará o corpo clínico na tomada de decisões assertivas o mais cedo possível. No entanto, por mais promissor que o ensaio seja, deve-se ter cuidado com a interpretação dos resultados, pois sugerimos, neste estudo, uma avaliação crítica frente ao ponto de corte para distinguir sugestivamente a microbiota indígena de potenciais patógenos que devem ser avaliados juntos ao clínico e condições patológicas do paciente, além dos resultados laboratoriais e da microbiologia convencional para confirmação diagnóstica e possíveis outras resistências correlacionadas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBANO, F. de M. RAYA-RODRIGUEZ, Maria Teresa. Validação e garantia da qualidade de ensaios laboratoriais. **Porto Alegre: Rede Metrológica RS**, 2009.

ALBERNAZ M.P GONÇALVES, E. O. et al. Práticas assistenciais de enfermagem e prevenção da pneumonia associada à ventilação mecânica em uti. **Revista de Enfermagem UFPE**, v. 9, n. 12, p. 1069-1077, 2015.

ALMEIDA JÚNIOR, Elias Rodrigues de et al. Estudo multicêntrico de infecção de corrente sanguínea e pneumonia nosocomial em pacientes internados em UTIs de adultos no estado de Minas Gerais. 2021. Dissertação (Mestrado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2021. DOI <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2021.514>.

AMERICAN THORACIC SOCIETY et al. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 171, n. 4, p. 388, 2005.

ANAND, Nitin; KOLLEF, Marin H. The alphabet soup of pneumonia: CAP, HAP, HCAP, NHAP, and VAP. In: **Seminars in respiratory and critical care medicine**. © Thieme Medical Publishers, 2009. p. 003-009.

ANDRADE, D. A.; LEOPOLDO, V.C; HAAS, V. J. Ocorrências de bactérias multirresistentes em um centro de terapia intensiva de um hospital brasileiro de emergência. **Rev. Bras. Ter. Intensiva**, São Paulo, v. 18, n. 1, p. 31-37, Jan., 2006.

ALOTAIBI, Ahmed K.; ALSHAYIQI, Mohammed; RAMALINGAM, Sundar. Does the presence of oral care guidelines affect oral care delivery by intensive care unit nurses? A survey of Saudi intensive care unit nurses. **American journal of infection control**, v. 42, n. 8, p. 921-922, 2014.

ASSICOT, Marcel et al. High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection. **The Lancet**, v. 341, n. 8844, p. 515-518, 1993.

ASSUNÇÃO, Raíssa Guará; PEREIRA, Wellison Amorim; ABREU, Afonso Gomes. Pneumonia bacteriana: aspectos epidemiológicos, fisiopatologia e avanços no diagnóstico. **Rev Inv Biomédica**, v. 10, n. 1, p. 83-91, 2018.

AVDIC, Edina; CARROLL, Karen C. The role of the microbiology laboratory in antimicrobial stewardship programs. **Infectious Disease Clinics**, v. 28, n. 2, p. 215-235, 2014.

AYKAC, Kubra; OZSUREKCI, Yasemin; TANIR BASARANOGU, Sevgen. Future directions and molecular basis of ventilator associated pneumonia. **Canadian respiratory journal**, v. 2017, 2017.

BAHLIS, Laura Fuchs *et al.* Perfil clínico, epidemiológico e etiológico de pacientes internados com pneumonia adquirida na comunidade em um hospital público do interior do Brasil. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 44, p. 261-266, 2018.

BALTHAZAR, A. B. et al. Diagnostic investigation of ventilator-associated pneumonia using bronchoalveolar lavage: comparative study with a postmortem lung biopsy. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, n. 8, p. 993-1001, 2001.

BARTLETT, John G.; GILBERT, David N.; SPELLBERG, Brad. Seven ways to preserve the miracle of antibiotics. **Clinical infectious diseases**, v. 56, n. 10, p. 1445-1450, 2013.

BASSETTI, Matteo et al. Characteristics of an ideal nebulized antibiotic for the treatment of pneumonia in the intubated patient. **Annals of intensive care**, v. 6, n. 1, p. 1-8, 2016.

BERALDO, Carolina Contador. **Prevenção da pneumonia associada à ventilação mecânica: revisão integrativa**. 2008. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

AN, Shi-qj; BERG, Gabriele. *Stenotrophomonas maltophilia*. **Trends in microbiology**, v. 26, n. 7, p. 637-638, 2018.

BEZERRA, Emanuela Lima *et al.* Prevalência de pneumonia em pacientes de uma unidade de terapia intensiva de um hospital-escola de Fortaleza-CE. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**, v. 25, n. 2 Sup, p. 20-24, 2012.

BLASI, Francesco *et al.* 100 years of respiratory medicine: pneumonia. **Respiratory medicine**, v. 101, n. 5, p. 875-881, 2007.

BODEY, Gerald P.; ROLSTON, Kenneth VI. Management of fever in neutropenic patients. **Journal of infection and chemotherapy**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2001.

BONAFEDE, Machaon M. *et al.* Incidence and cost of CAP in a large working-age population. **The American journal of managed care**, v. 18, n. 7, p. 380-387, 2012.

BORK, Luany Caroline Adamowicz *et al.* Adesão às medidas preventivas de pneumonia associada à ventilação mecânica. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 5, n. 1, p. 12-16, 2015.

BRABO, Bruna Christine Floriano; ZEITOUN, Sandra Salloum. Pneumonia associada à ventilação mecânica: avaliação do conhecimento da equipe de enfermagem de uma terapia intensiva/Ventilator-associated pneumonia: knowledge level of the nursing team of an intensive care. **Arquivos médicos dos hospitais e da faculdade de ciências médicas da Santa Casa de São Paulo**, p. 130-138, 2017.

BRASIL, Ministério da Saúde. Banco de dados do Sistema Único de Saúde-DATASUS. Disponível em <http://www.datasus.gov.br> [Acessado em 3 de março de 2021] .

BRASIL, Resolução RDC. Nº 166, de 24 de julho de 2017. **Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Anvisa, Ed. Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Diretoria Colegiada: Brasília, 2017.**

BRINKMANN, Volker *et al.* Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **science**, v. 303, n. 5663, p. 1532-1535, 2004.

BRITO, Rita de Cássia Coelho Moraes de *et al.* Características clínicas e desfechos de pneumonia comunitária aguda em crianças hospitalizadas em serviço público de

referência de Pernambuco, Brasil (2010-2011). **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 16, p. 247-257, 2016.

BURNS, Alan R.; SMITH, C. Wayne; WALKER, David C. Unique structural features that influence neutrophil emigration into the lung. **Physiological reviews**, v. 83, n. 2, p. 309-336, 2003.

CANTÓN, Rafael; GONZÁLEZ-ALBA, José María; GALÁN, Juan Carlos. CTX-M enzymes: origin and diffusion. **Frontiers in microbiology**, v. 3, p. 110, 2012.

CANTÓN, Rafael et al. Inappropriate use of antibiotics in hospitals: the complex relationship between antibiotic use and antimicrobial resistance. **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica**, v. 31, p. 3-11, 2013.

CELIS, Rosa et al. Nosocomial pneumonia: a multivariate analysis of risk and prognosis. **Chest**, v. 93, n. 2, p. 318-324, 1988.

CHAHOUD, Jad; SEMAAN, Adele; ALMOOSA, Khalid F. Ventilator-associated events prevention, learning lessons from the past: a systematic review. **Heart & Lung**, v. 44, n. 3, p. 251-259, 2015.

CHAMBERS, Henry F. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. **Clinical microbiology reviews**, v. 10, n. 4, p. 781-791, 1997.

CHASTRE, Jean; FAGON, Jean-Yves. Ventilator-associated pneumonia. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 165, n. 7, p. 867-903, 2002.

CHLEBICKI, Maciej Piotr; SAFDAR, Nasia. Topical chlorhexidine for prevention of ventilator-associated pneumonia: a meta-analysis. **Critical care medicine**, v. 35, n. 2, p. 595-602, 2007.

CORRÊA, Ricardo de Amorim et al. Recomendações para o manejo da pneumonia adquirida na comunidade 2018. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 44, p. 405-423, 2018.

CORRÊA, Ricardo de Amorim et al. Burden of disease by lower respiratory tract infections in Brazil, 1990 to 2015: estimates of the Global Burden of Disease 2015 study. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 20, p. 171-181, 2017.

CORRÊA, Ricardo de Amorim et al. Brazilian guidelines for community-acquired pneumonia in immunocompetent adults-2009. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, p. 574-601, 2009.

COSTA, André Nathan et al. The pulmonary microbiome: challenges of a new paradigm. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 44, p. 424-432, 2018.

COSTA, Janice Barbieri et al. OS PRINCIPAIS FATORES DE RISCO DA PNEUMONIA ASSOCIADA À VENTILAÇÃO MECÂNICA EM UTI ADULTA. **Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente**, v. 7, n. 1, p. 80-92, 2016.

CUNHA, Vinícius de Oliveira. Bactérias multirresistentes: Klebsiella pneumoniae carbapenemase enzima KPC nas Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde. Belo Horizonte. **Monografia [Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas]-Universidade Federal de Minas Gerais**, 2014.

CURETIS G. H Evaluation of automatic class III designation for Universo LRT application and Unyvero system, DEN170047. **Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos EUAL, Food and Drug Administration**, Washington, DC. 2018

DAMAS, Pierre et al. Prevention of ventilator-associated pneumonia by noble metal coating of endotracheal tubes: a multi-center, randomized, double-blind study. **Annals of Intensive Care**, v. 12, n. 1, p. 1-10, 2022.

DESIMONI, María Celia; ESQUIVEL, Graciela Patricia; MERINO, Luis Antonio. Fecal colonization by extended-spectrum beta-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae in a neonatal intensive care unit. **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica**, v. 22, n. 9, p. 507-511, 2004.

Diretrizes brasileiras para tratamento das pneumonias adquiridas no hospital e das associadas à ventilação mecânica - 2007. **J Bras Pneumol**. 2007.

DONALISIO, Maria Rita; ARCA, Carlos Henrique Mamud; MADUREIRA, Paulo Roberto de. Perfil clínico, epidemiológico e etiológico de pacientes com pneumonia adquirida na comunidade internados em um hospital geral da microrregião de Sumaré, SP. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 37, n. 2, p. 200-208, 2011.

DONLAN, Rodney M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging infectious diseases**, v. 8, n. 9, p. 881, 2002.

FONSECA JR, A. A. et al. Manual de Verificação de Desempenho de Métodos para Diagnóstico Molecular de Doenças Infecciosas na Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários. **MAPA/ACS, Brasília. 57p**, 2015.

FIGUEIREDO, Agnes Marie Sá et al. The role of biofilms in persistent infections and factors involved in ica-independent biofilm development and gene regulation in *Staphylococcus aureus*. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 602-620, 2017.

FRIDKIN, Scott K. Increasing prevalence of antimicrobial resistance in intensive care units. **Critical care medicine**, v. 29, n. 4, p. N64-N68, 2001.

GALIANA, Antonio et al. Evaluation of the Sepsis Flow Chip assay for the diagnosis of blood infections. **PLoS One**, v. 12, n. 5, p. e0177627, 2017.

GELATTI, Luciane Cristina et al. *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina: disseminação emergente na comunidade. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 5, p. 501-506, 2009.

GIBOT, Sébastien et al. Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells and the diagnosis of pneumonia. **New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 5, p. 451-458, 2004.

GUIMARÃES, Márcio Martins de Queiroz; ROCCO, José Rodolfo. Prevalência e prognóstico dos pacientes com pneumonia associada à ventilação mecânica em um hospital universitário. **Jornal brasileiro de pneumologia**, v. 32, n. 4, p. 339-346, 2006.

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**, v. 33, p. 667-679, 2010.

HARTZELL, Joshua D. et al. *Acinetobacter* pneumonia: a review. **Medscape General Medicine**, v. 9, n. 3, p. 4, 2007.

HENKES, Waldir Emilio. Identificação de Enterococcus sp. e resistência a antimicrobianos em amostras de regiões costeiras da Lagoa dos Patos. 2010. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - Microbiologia de Ambientes Naturais e Antropogênicos, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, **Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.** (44p). Julho, 2010

JAHN, Kathleen et al. Molecular diagnostics for bacterial infections in bronchoalveolar lavage—a case-control, pilot study. **Swiss Medical Weekly**, n. 39, 2015.

JAMAL, Wafaa et al. Evaluation of Curetis Unyvero, a multiplex PCR-based testing system, for rapid detection of bacteria and antibiotic resistance and impact of the assay on management of severe nosocomial pneumonia. **Journal of clinical microbiology**, v. 52, n. 7, p. 2487-2492, 2014.

KOENIG, Steven M.; TRUWIT, Jonathon D. Ventilator-associated pneumonia: diagnosis, treatment, and prevention. **Clinical microbiology reviews**, v. 19, n. 4, p. 637-657, 2006.

KONEMAN, E. W. et al. Diagnóstico Microbiológico, Editora Médica e Científica Ltda. **RJ. 1465p**, 2001.

KOPF, Manfred et al. Complement component C3 promotes T-cell priming and lung migration to control acute influenza virus infection. **Nature medicine**, v. 8, n. 4, p. 373-378, 2002.

KUYPERS, Jane; JEROME, Keith R. Applications of digital PCR for clinical microbiology. **Journal of clinical microbiology**, v. 55, n. 6, p. 1621-1628, 2017.

KYRIAZOPOULOU, Evdoxia et al. BioFire® FilmArray® pneumonia panel for severe lower respiratory tract infections: subgroup analysis of a randomized clinical trial. **Infectious diseases and therapy**, v. 10, n. 3, p. 1437-1449, 2021.

LEE, H.-W. et al. Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of Acinetobacter baumannii to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. **Clinical microbiology and infection**, v. 14, n. 1, p. 49-54, 2008.

LEE, K. et al. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo- β -lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. **Clinical microbiology and infection**, v. 7, n. 2, p. 88-91, 2001.

LOKE, Yoon K. et al. Value of severity scales in predicting mortality from community-acquired pneumonia: systematic review and meta-analysis. **Thorax**, v. 65, n. 10, p. 884-890, 2010.

LOUGHRAN, Allister J.; ORIHUELA, Carlos J.; TUOMANEN, Elaine I. *Streptococcus pneumoniae*: invasion and inflammation. **Microbiology spectrum**, v. 7, n. 2, p. 7.2. 15, 2019.

LOWY, Franklin D. *Staphylococcus aureus* infections. **New England Journal of medicine**, v. 339, n. 8, p. 520-532, 1998.

MACEDO, Jefferson Lessa S. de et al. Fatores de risco da sepse em pacientes queimados. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 32, n. 4, p. 173-177, 2005.

MACHADO, Daniel et al. Pneumonia: Tratamento e Evolução. **Cadernos UniFOA**, v. 5, n. 14, p. 65-69, 2010.

MACKAY, Vivian L. et al. Gene expression analyzed by high-resolution state array analysis and quantitative proteomics: response of yeast to mating pheromone. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 3, n. 5, p. 478-489, 2004.

MANDELL, Lionel A. et al. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. **Clinical infectious diseases**, v. 44, n. Supplement_2, p. S27-S72, 2007.

MARINHO, Daniel Savignon et al. Vancomicina, estudo de utilização com ênfase em suas reações adversas. 2005. Tese de Doutorado.

MATHAI, Ashu Sara et al. Incidence and attributable costs of ventilator-associated pneumonia (VAP) in a tertiary-level intensive care unit (ICU) in northern India. **Journal of infection and public health**, v. 8, n. 2, p. 127-135, 2015.

MENDONÇA, Daniela Lima; RIBEIRO, Elisa Vilela; SILVA, Janaína Teixeira Nunes. Prevalência e perfil de sensibilidade dos microrganismos isolados em aspirado traqueal de pacientes com pneumonia associada à ventilação mecânica em unidade de terapia intensiva. **CEP**, v. 36301, p. 182, 2019.

MENEZES, Everardo Albuquerque et al. Frequency of *Serratia* sp in urine infections of intern patients in the Santa Casa de Misericórdia in Fortaleza. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 1, 2004.

MIZGERD, Joseph P. Acute lower respiratory tract infection. **New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 7, p. 716-727, 2008.

Mobius Life Science, **Kit Multi Sepsis Chip**. Disponível em: <<https://mobiuslife.com.br/sepsis/>>. Acesso em: 29 de Julho de 2019.

MORAIS, Teresa Márcia Nascimento de et al. A importância da atuação odontológica em pacientes internados em unidade de terapia intensiva. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 18, n. 4, p. 412-417, 2006.

MOREIRA, Mirna Giselle. Avaliação de métodos moleculares para detecção de *Acinetobacter baumannii* multidroga resistentes recuperados de pacientes com suspeita de pneumonia associada à ventilação mecânica. 2017. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

MOREIRA, Michel Rodrigues; GONTIJO FILHO, Paulo Pinto. Multidrug-resistant pathogens causing ventilator-associated pneumonia: Risk factors, empirical antimicrobial therapy and outcome of patients in an intensive care unit (ICU) of a Brazilian university hospital. **International Journal of Medicine and Medical Sciences**, v. 4, n. 9, p. 204-210, 2012.

MORENO, Marcelo Spejorin et al. Proteína C-reativa como marcador de evolução da pneumonia nosocomial. 2011.

MOURA, Juliana Del Grossi et al. Enterococo resistente à vancomicina em UTI pediátrica: descrição de um caso e revisão da literatura. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 24, n. 2, p. 185-189, 2006.

MUSHER, Daniel M. et al. Can an etiologic agent be identified in adults who are hospitalized for community-acquired pneumonia: results of a one-year study. **Journal of Infection**, v. 67, n. 1, p. 11-18, 2013.

MUSHER, Daniel M.; THORNER, Anna R. Community-acquired pneumonia. **New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 17, p. 1619-1628, 2014.

NAKANO, V.; NISHIYAMA, S. A. Beta-lactamases: sua importância na resistência bacteriana. v. 10, 2014.

NATHAN, Carl. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nature reviews immunology**, v. 6, n. 3, p. 173-182, 2006.

NUNES, Bruno Pereira *et al.* Hospitalização em idosos: associação com multimorbidade, atenção básica e plano de saúde. **Revista de Saúde Pública**, v. 51, 2017.

OLIVEIRA, CHEILA GUIMARÃES et al. PERFIL DE RESISTÊNCIA E INCIDÊNCIA DE *Klebsiella pneumoniae* EM UM HOSPITAL PÚBLICO DE ENSINO. **Uningá Review Journal**, v. 25, n. 3, 2016.

PHILLIPS, Estelle; PUGH, Derek. **EBOOK: How to Get a PhD: A Handbook for Students and their Supervisors**. McGraw-Hill Education (UK), 2015.

PIRES, Eduardo José Valença Cordeiro et al. Análise epidemiológica de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de hospital universitário. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 21, n. 4, p. 384-390, 2009.

PRINA, Elena; RANZANI, Otávio T.; TORRES, Antoni. Community-acquired pneumonia. **The Lancet**, v. 386, n. 9998, p. 1097-1108, 2015.

POVOA, P. et al. C-reactive protein as a marker of ventilator-associated pneumonia resolution: a pilot study. **European Respiratory Journal**, v. 25, n. 5, p. 804-812, 2005.

RELLO, Jordi et al. Epidemiology and outcomes of ventilator-associated pneumonia in a large US database. **Chest**, v. 122, n. 6, p. 2115-2121, 2002.

ROGERS, Geraint B. et al. Respiratory microbiota: addressing clinical questions, informing clinical practice. **Thorax**, v. 70, n. 1, p. 74-81, 2015.

SADER, Hélio S. et al. Perfil de sensibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas do trato respiratório baixo de pacientes com pneumonia internados em hospitais brasileiros: resultados do Programa SENTRY, 1997 e 1998. **Jornal de Pneumologia**, v. 27, n. 2, p. 59-67, 2001.

SCALES, Damon C. The implications of a tracheostomy for discharge destination. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 192, n. 4, p. 404-405, 2015.

SATTAR, Saud Bin Abdul; SHARMA, Sandeep. Bacterial pneumonia. 2018.

SBIM, Sociedade Brasileira de Imunização. **Dia Mundial da Pneumonia 2016**, Disponível em: <<https://sbim.org.br/noticias/585-dia-mundial-da-pneumonia-2016>>. Acesso em: 11 de Setembro de 2020.

SCHULTE, Berit et al. Detection of pneumonia associated pathogens using a prototype multiplexed pneumonia test in hospitalized patients with severe pneumonia. **PLoS One**, v. 9, n. 11, p. e110566, 2014.

SHRIVASTAVA, Saurabh Raj Bihari Lal et al. World health organization releases global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. **Journal of Medical Society**, v. 32, n. 1, p. 76, 2018.

SILVA, Ruan Carlos Gomes da; SILVA, Amanda Cristina de Oliveira; OLIVEIRA, Sibebe Ribeiro de. Microbial resistance and frequency of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) in isolated from blood cultures. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 50, p. 421-427, 2014.

SILVEIRA, Gustavo Pozza et al. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 29, p. 844-855, 2006.

SOUDEIHA, Micheline AH et al. In vitro evaluation of the colistin-carbapenem combination in clinical isolates of *A. baumannii* using the checkerboard, Etest, and time-kill curve techniques. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7, p. 209, 2017.

SOUZA A.S. Prevalência de pneumonia associada à assistência à saúde em unidades de terapia intensiva. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2012.

SOUZA, Elaine Roberta Leite et al. Fisiopatologia da pneumonia nosocomial: uma breve revisão. **ARCHIVES OF HEALTH INVESTIGATION**, v. 9, n. 5, p. 485-492, 2020.

SOUZA, Dyenifer; SÁ, Geíza; MOREIRA, Michel. Pneumonias associadas à ventilação mecânica e a suscetibilidade aos antimicrobianos dos microrganismos isolados de pacientes da unidade de terapia intensiva de um hospital público mineiro. **HU Revista**, v. 47, p. 1-7, 2021.

SUAREZ, Cristina; GUDIOL, Francesc. Beta-lactam antibiotics. **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica**, v. 27, n. 2, p. 116-129, 2009.

TALEBI BEZMIN ABADI, Amin *et al.* World Health Organization report: current crisis of antibiotic resistance. **BioNanoScience**, v. 9, n. 4, p. 778-788, 2019.

TASBAKAN, M. Sezai et al. Comparison of bronchoalveolar lavage and mini-bronchoalveolar lavage in the diagnosis of pneumonia in immunocompromised patients. **Respiration**, v. 81, n. 3, p. 229-235, 2011.

TAVARES, Amanda Rodrigues. Infecções por *Serratia* spp. em ambientes de terapia intensiva: uma revisão integrativa. 2015.

TISSARI, Päivi et al. Accurate and rapid identification of bacterial species from positive blood cultures with a DNA-based microarray platform: an observational study. **The Lancet**, v. 375, n. 9710, p. 224-230, 2010.

TORRES, Antoni et al. Diagnostic value of quantitative cultures of bronchoalveolar lavage and telescoping plugged catheters in mechanically ventilated patients with bacterial pneumonia. **Am Rev Respir Dis**, v. 140, n. 2, p. 306-310, 1989.

Thermo Fisher Scientific. **DTT (dithiothreitol), Reducing Agents**. 11 de Setembro de 2020. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/R0861>;

VARDAKAS, K. Z. et al. Rapid molecular diagnostic tests in patients with bacteremia: evaluation of their impact on decision making and clinical outcomes. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 34, n. 11, p. 2149-2160, 2015.

VALLÉS, Jordi; MARISCAL, Dolors. Neumonía por *Pseudomonas aeruginosa*. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 23, p. 30-36, 2005.

VENCIA, W. et al. Validation according to ISO 16140: 2003 of a commercial real-time PCR-based method for detecting *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, and *C. lari* in foods. **International journal of food microbiology**, v. 177, p. 78-80, 2014.

VIEIRA, C.E.N.K., ANDRADE, P.S., COURA, A.S., ENDER B.C. e DUTRA, M.O.M. 2014. Acciones de enfermería para la prevención de la neumonía asociada a ventilación mecánica: revisión sistemática. **Enfermería Global**. Jun. 2014 DOI:<https://doi.org/10.6018/eglobal.13.3.191131>.

VON NUSSBAUM, Franz et al. Antibacterial natural products in medicinal chemistry—exodus or revival?. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 45, n. 31, p. 5072-5129, 2006.

WARDENBURG, Juliane Bubeck; SCHNEEWIND, Olaf. Vaccine protection against *Staphylococcus aureus* pneumonia. **The Journal of experimental medicine**, v. 205, n. 2, p. 287-294, 2008.

WANG, Zhang et al. Lung microbiome dynamics in COPD exacerbations. **European Respiratory Journal**, v. 47, n. 4, p. 1082-1092, 2016.

WATSON, JD; MYERS, RM; CAUDY, AA; WITKOWSKI, JA. DNA Recombinante – Genes e Genomas, 3a Ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2009.

WEBBER, Daniel M. et al. Evaluation of the BioFire FilmArray pneumonia panel for detection of viral and bacterial pathogens in lower respiratory tract specimens in the setting of a tertiary care academic medical center. **Journal of clinical microbiology**, v. 58, n. 7, p. e00343-20, 2020.

WILLIAMS, J. D. β -lactamases and β -lactamase inhibitors. **International journal of antimicrobial agents**, v. 12, p. S3-S7, 1999.

YONG, Dongeun et al. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, bla NDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 12, p. 5046-5054, 2009.

ZAKHARKINA, Tetyana et al. The dynamics of the pulmonary microbiome during mechanical ventilation in the intensive care unit and the association with occurrence of pneumonia. **Thorax**, v. 72, n. 9, p. 803-810, 2017.