

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós-graduação em Microbiologia

Cássia Lopes Silva

**AVALIAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DA RESISTÊNCIA A
FÁRMACOS ANTIMICROBIANOS DE BASTONETES GRAM- NEGATIVOS
NÃO FERMENTADORES ISOLADOS DE ESPÉCIMES CLÍNICOS
HOSPITALARES**

Belo Horizonte

2021

Cássia Lopes Silva

**AVALIAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DA RESISTÊNCIA A
FÁRMACOS ANTIMICROBIANOS DE BASTONETES GRAM-NEGATIVOS
NÃO FERMENTADORES ISOLADOS DE ESPÉCIMES CLÍNICOS
HOSPITALARES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Luiz de Macedo Farias

Coorientadoras: Vera Lúcia dos Santos

Paula Prazeres Magalhães

Belo Horizonte

2021

043

Silva, Cássia Lopes.

Avaliação fenotípica e genotípica da resistência a fármacos antimicrobianos de bastonetes gram- negativos não fermentadores isolados de espécimes clínicos hospitalares [manuscrito] / Cássia Lopes Silva. – 2021.

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

Orientador: Luiz de Macedo Farias. Coorientadoras: Vera Lúcia dos Santos; Paula Prazeres Magalhães.

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

1. Microbiologia. 2. Resistência Microbiana a Medicamentos. 3. Acinetobacter baumannii. 4. Pseudomonas aeruginosa. 5. Stenotrophomonas maltophilia. I. Farias, Luiz de Macedo. II. Santos, Vera Lúcia dos. III. Magalhães, Paula Prazeres. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 579



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

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE CÁSSIA LOPES SILVA

Nº REGISTRO: **2019653677**

Às 14:00 horas do dia **27 de AGOSTO de 2021**, reuniu-se, por via remota, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Simone Gonçalves Santos-Key (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Natália Rocha Guimarães (Fundação Ezequiel Dias (FUNED)), Dra. Vera Lúcia dos Santos - Coorientadora, Paula Prazeres Magalhães - Coorientadora e o Prof. Luiz de Macêdo Farias – Orientador, para julgar o trabalho final “Avaliação Fenotípica E Genotípica Da Resistência A Fármacos Antimicrobianos De Bastonetes Gram- Negativos Não Fermentadores Isolados De Espécimes Clínicos Hospitalares”, da aluna **Cassia Lopes Silva**, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Luiz de Macêdo Farias - orientador, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. O candidato tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da dissertação ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Membros da banca:

Dra. Simone Gonçalves Santos-Key

Dra. Natália Rocha Guimarães

De acordo:

Prof. Luiz de Macêdo Farias(orientador)

Dra. Vera Lúcia dos Santos(Coorientadora)

Paula Prazeres Magalhães(Coorientadora)

Profa. Danielle da Glória de Souza(Coordenadora do PPGM/UFMG)

Belo Horizonte, 27 de agosto de 2021

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Simone Gonçalves dos Santos, Professora do Magistério Superior**, em 31/08/2021, às 15:39, 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 **Luiz de Macedo Farias, Professor do Magistério Superior**, em 01/09/2021, às 00:36, 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 **Paula Prazeres Magalhaes, Professora do Magistério Superior**, em 01/09/2021, às 00:40, 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 **Natália Rocha Guimarães, Usuário Externo**, em 01/09/2021, às 09:36, 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 **Vera Lucia dos Santos, Servidor(a)**, em 08/09/2021, às 08:45, 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 **Daniele da Gloria de Souza, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 08/09/2021, às 20:56, 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 **0877128** e o código CRC **B9567A25**.

RESUMO

A introdução dos antimicrobianos, na década de 1930, revolucionou a prática médica e promoveu avanços na abordagem terapêutica de pacientes com doenças infecciosas. A princípio, imaginava-se que eles seriam uma solução absolutamente efetiva, que proporcionaria a cura destes pacientes, controlando doenças que, até então, dizimavam populações. Contudo, logo se percebeu que o emprego desses fármacos poderia promover um efeito indesejado, qual seja a seleção de amostras resistentes aos mesmos, problemática cada vez mais preocupante. Entre os locais que mais favorecem a disseminação da resistência aos antimicrobianos, merecem menção os ambientes relacionados à assistência à saúde. Dentre os microrganismos de relevância clínica atual, destacam-se os bastonetes Gram- negativos não fermentadores, entre eles, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Stenotrophomonas maltophilia*. Este estudo visa à avaliação fenotípica e genotípica da resistência a antimicrobianos de amostras de *A. baumannii*, *P. aeruginosa* e *S. maltophilia* isoladas de pacientes hospitalizados, respectivamente. Os perfis fenotípico e genotípico de resistência foram avaliados por disco-difusão e reação de polimerização em cadeia. Os resultados obtidos para as amostras de *A. baumannii* revelaram percentuais de resistência a antimicrobianos bem elevados. Destaca-se a resistência aos β -lactâmicos, superior a 80%, fármacos mais comumente utilizados. Detectou-se também, com frequência, genes que codificam resistência a este grupo de antimicrobianos, como *blaOXA-23*, *blaKPC*, *blaVIM* e *blaOXA-143*. *P. aeruginosa* apresentou percentuais de resistência fenotípica menores, variando entre 10 e 34%, mas que ainda despertam preocupação. Nas amostras da espécie, foram observados os marcadores genéticos *aac(6')-Ib-cr*, *blaBEL-1*, *blaCTX-M*, *blaGES*, *blaKPC-2*, *blaSHV* e *eblaVIM*. Já *S. maltophilia* apresentou uma amostra resistente aos dois antimicrobianos testados e nenhum marcador de resistência, em contrapartida às outras três amostras do microrganismo que, embora tenham se mostrado sensíveis no antibiograma, albergavam marcadores genéticos relacionados à resistência a antimicrobianos. O estudo da resistência bacteriana a fármacos antimicrobianos e dos mecanismos relacionados à expressão da característica é uma ferramenta importante para subsidiar o delineamento de estratégias visando ao controle da evolução das taxas de resistência, minimizando as repercussões dessa propriedade.

Palavras-chave: resistência a antimicrobianos; *Acinetobacter baumannii*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Stenotrophomonas maltophilia*.

ABSTRACT

The introduction of antimicrobials in the 1930s revolutionized medical practice and promoted advances in therapeutic approach to patients with infectious diseases. Originally, it was thought that they would be an absolutely effective solution, providing the cure for these patients, controlling diseases that, until then, had decimated populations. However, it was soon realized that the use of these drugs could promote an unwanted effect, namely the selection of samples resistant to them, an increasingly worrying conundrum. Among the sites that most favor the spread of antimicrobial resistance, the environments related to health care deserve mention. Among the microorganisms of current clinical relevance, the non-fermenting Gram-negative rods stand out, including *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia*, respectively. This study aims at the phenotypic and genotypic evaluation of antimicrobial resistance in samples of *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *S. maltophilia* sampled from hospitalized patients. The phenotypic and genotypic resistance profiles were evaluated by disk diffusion and polymerase chain reaction. The results obtained for the samples of *A. baumannii* revealed high percentages of resistance to antimicrobials. β -lactams resistance, the most commonly used drugs, stood out as higher than 80%. Genes that encode resistance to this group of antimicrobials, such as *blaOXA-23*, *blaKPC*, *blaVIM* and *blaOXA-143*, were also frequently detected. *P. aeruginosa* showed lower percentages of phenotypic resistance, ranging between 10 and 34%, but that still arouse concern. In samples of these species, the genetic markers *aac (6')-Ib-cr*, *blaBEL-1*, *blaCTX-M*, *blaGES*, *blaKPC-2*, *blaSHV* and *blaVIM* were observed. Contrastingly, *S. maltophilia* presented a sample resistant to the two tested antimicrobials and no resistance marker, in contrast to the other three samples of the microorganism which, although were shown to be sensitive in the antibiogram, harbored genetic markers related to resistance to antimicrobials. The study of bacterial resistance to antimicrobial drugs and mechanisms related to the expression of the trait are an important tool to support the design of strategies aimed at controlling the evolution of resistance rates, minimizing the repercussions of this property.

Keywords: antimicrobial resistance; *Acinetobacter baumannii*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Stenotrophomonas maltophilia*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Recombinação genética bacteriana	19
Figura 2 Ilustração esquemática de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e dos seus principais fatores de virulência	32
Figura 3: Ilustração do antibiograma realizado por disco-difusão.....	50

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Painel de antimicrobianos testados para cada espécie bacteriana	44
Quadro 2: Painel de genes de resistência testados para cada uma das espécies bacterianas.	46
Quadro 3: Controles positivos empregados para cada marcador genético	47
Quadro 4: Legenda de cores correspondentes às datas de coletas das amostras.....	62
Quadro 5: Lista de primers, condições de reação e tamanho dos amplicons para cada gene	92

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Perfil de distribuição das 108 amostras clínicas de BGNNFs estudadas.....	49
Gráfico 2: Perfil de resistência a antimicrobianos das 54 amostras de <i>Acinetobacter baumannii</i>	51
Gráfico 3: Perfil de resistência a antimicrobianos das 50 amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	53
Gráfico 4: Perfil de resistência a antimicrobianos das quatro amostras de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	55
Gráfico 5: Marcadores genéticos de resistência a antimicrobianos observados nas 54 amostras de <i>Acinetobacter baumannii</i>	56
Gráfico 6: Marcadores genéticos de resistência a antimicrobianos observados nas 50 amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	58
Gráfico 7: Marcadores genéticos de resistência a antimicrobianos observados nas quatro amostras de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	60
Gráfico 8: Perfil de distribuição das amostras de <i>Acinetobacter baumannii</i> em função da distância dos dados multivariados.	63
Gráfico 9: Perfil de distribuição das amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em função da distância dos dados multivariados.....	64
Gráfico 10: Perfil de distribuição das amostras de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> em função da distância dos dados multivariados	65

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABC: superfamília ATP *binding cassette*

AADs: adenilação pelas adeniltransferases aminoglicosídicas AMEs:
enzimas modificadoras específicas

AmpC: β -lactamase da classe C

ANTs: adenilação pelas nucleotidiltransferases aminoglicosídicas ANVISA:
Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APHS: fosforilação por fosfotransferases aminoglicosídicas ATCC:
American Type Culture Collection

AttI: sítio de recombinação

Bap: proteína associada ao biofilme BBL:

Brucella Broth

BGNF: bastonete Gram negativo não fermentador BHI:

Brain Heat Infusion

CIM: concentração inibitória mínima

CLSI: *Clinical Laboratory Standards Institute*

DNA: ácido desoxirribonucleico

ES β L: β -lactamase de espectro estendido

IRAS: infecções relacionadas à assistência à saúde LPS:

lipopolissacarídeo da parede celular

MATE: família de extrusão de compostos tóxicos e de multidroga M β LS:

Metallo- β -lactamases

MDR: Múltipla Resistência A Drogas MFS:

superfamília facilitadora

MHA: *Mueller Hinton Agar*

min: minutos mL:

mililitros mM:

mili molar

NDM: New Dheli metallo-betalactamase ng:

nanogramas

nm: nanômetro

OMP: proteína de membrana externa

OMS: Organização Mundial da Saúde

ORFs: *open reading frames*

OXA: oxacilinasas

PACE: efluxo de compostos antimicrobianos de proteobactérias PAV:
pneumonia associada à ventilação mecânica

pb: pares de bases

PBP: proteínas de ligação à penicilina PCoA:
análise de coordenadas principais PCR: reação
de polimerização em cadeia

PHAST: phylogenetic analysis with space/time models PSE:
enzimas específicas de *Pseudomonas*

QSMs: moléculas de quórum sensing RNA:
ácido ribonucléico

RND: família resistência-nodulação-divisão

rpm: rotação por minuto

RTX: família de repetições em
toxinasSI: Super-*integrons*

SMR: família de baixa resistência a multidrogas SST:
sistema de secreção tipo

TSA: *Tryptic Soy Agar*

U: unidade

UFC: unidade formadora de colônia

UTI: unidade de terapia intensiva

WHO: World Health Organization

μL: microlitros

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Os fármacos antimicrobianos	14
1.1.1 A descoberta dos antibacterianos acompanhada do surgimento da resistência e suas implicações.....	14
1.1.2 Bases genéticas e bioquímicas da resistência a antimicrobianos	17
1.1.2.1 Recombinação genética em bactérias	18
1.1.2.2 Plasmídeos	19
1.1.2.3 Sistema <i>integrons</i> / cassetes gênicos	20
1.1.2.4 Bombas de efluxo	22
1.2 Microrganismos de relevância clínica	23
1.2.1 ESKAPE	23
1.2.2 Bastonetes Gram-negativos não fermentadores.....	24
1.2.2.1 Características gerais	24
1.2.2.2 <i>Acinetobacter baumannii</i>	25
1.2.2.2.1 Epidemiologia	25
1.2.2.2.2 Patogenicidade	26
1.2.2.2.3 Suscetibilidade de <i>A. baumannii</i> a antimicrobianos.....	27
1.2.2.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30
1.2.2.3.1 Epidemiologia	30
1.2.2.3.2 Patogenicidade	31
1.2.2.3.3 Suscetibilidade de <i>P. aeruginosa</i> a antimicrobianos	33
1.2.2.4 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	37

1.2.2.4.1	Epidemiologia	37
1.2.2.4.2	Patogenicidade	38
1.2.2.4.3	Suscetibilidade de <i>S. maltophilia</i> a antimicrobianos	39
2.	JUSTIFICATIVA	40
3.	OBJETIVOS	41
3.1	Objetivo geral.....	41
3.2	Objetivos específicos	41
4.	MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1	Amostras bacterianas	42
4.2	Confirmação da identificação das amostras bacterianas.....	42
4.3	Determinação do perfil de suscetibilidade a fármacos antimicrobianos.....	43
4.4	Pesquisa de marcadores genéticos de resistência a fármacos antimicrobianos.	45
4.4.1	Extração de DNA	45
4.4.2	Reação de polimerização em cadeia.....	45
4.5	Análise estatística	48
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1	Perfil das amostras bacterianas estudadas.....	49
5.2	Antibiograma.....	50
5.3	Perfil genotípico de resistência	56
5.4	Análises estatísticas	61
6.	CONCLUSÕES	66
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
8.	ANEXO	92

1. INTRODUÇÃO

1.1 Os fármacos antimicrobianos

1.1.1 A descoberta dos antibacterianos acompanhada do surgimento da resistência e suas implicações

A descoberta dos agentes infecciosos, no final do século XIX, estimulou a busca por regimes terapêuticos e preventivos adequados. Entretanto, o tratamento bem sucedido de indivíduos com doenças de natureza infecciosa, realizado com bases científicas sólidas, de uma forma mais abrangente, ocorreu apenas meio século depois, com a descoberta e a introdução dos antimicrobianos na prática clínica. Além de tratar doenças infecciosas, os antibióticos possibilitaram muitos procedimentos médicos modernos, como tratamento de câncer, transplante de órgãos e cirurgias de peito aberto (DAVIES; DAVIES, 2010; GAUTAMA, 2022).

O primeiro fato de grande relevância a ser reconhecido foi o trabalho de Paul Erlich, que desenvolveu o salvarsan, um medicamento obtido a partir de mais de mil combinações de arsênio, empregado para o tratamento de pacientes com sífilis, em 1910. Este foi o marco de início da quimioterapia como ciência e, de forma importante, reconheceu como fundamental o princípio da toxicidade seletiva. Porém, a quimioterapia moderna, aplicada de forma mais abrangente, teve início com a introdução das sulfonamidas, por Gerard Domagk, na década de 1930. Ainda, merece menção especial a penicilina, descoberta por Alexander Fleming, em 1928, e utilizada na clínica médica cerca de 10 anos depois, cujo impacto no tratamento de soldados durante a segunda guerra mundial é quase imensurável (COHEN; TARTASKY, 1997; PEREIRA; PITA, 2005; ZAFFIRI *et al.*, 2012).

A princípio, em especial, após os resultados alcançados com o emprego da penicilina na prática médica, acreditava-se que o problema de controle das doenças infecciosas estava solucionado. Parecia que os fármacos antimicrobianos, que atuavam como “balas mágicas”, conforme definido por Paul Erlich, capazes de atuar seletivamente contra as bactérias alvo, seriam a solução para a questão. Entretanto, em muito pouco tempo, reconheceu-se que esta avaliação inicial estava bastante equivocada (WASAN *et al.*, 2023).

Todos os fármacos antimicrobianos introduzidos na terapêutica provaram ter eficácia e vida útil finitas, visto que a resistência microbiana aos mesmos sempre aparece (WRIGHT;

POINAR, 2012; DEVANEY; SCOTT, 2022). Isso pôde ser observado já com os primeiros antimicrobianos utilizados, as sulfonamidas e a penicilina, para os quais a resistência foi relatada rapidamente, apenas alguns anos após terem sido descobertos (DAVIES; DAVIES, 2010; WRIGHT; POINAR, 2012). Merece destaque a estreptomicina, descoberta em 1943 e introduzida na prática médica em 1946, quando também já se detectou resistência à mesma (LEWIS, 2013).

Nos anos 50, houve surtos generalizados, em diversos hospitais, associados a amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes a penicilina, tetraciclina, estreptomicina e eritromicina (COHEN; TARTASKY, 1997; JENELLE, 2023). Nesta mesma década, também foi observado que algumas bactérias Gram-negativas, como *Klebsiella*, *Proteus* e *Pseudomonas aeruginosa*, que eram, até o momento, suscetíveis aos antimicrobianos disponíveis na época, estavam assumindo uma relevância maior como causa de infecções hospitalares. Assim, estes organismos passaram a ser considerados, na década de 1960, importantes patógenos hospitalares e, de alguma forma, isso se associava com a resistência a fármacos antimicrobianos que os mesmos passaram a expressar (WHO SCIENTIFIC WORKING GROUP, 1983; COHEN; TARTASKY, 1997). Como resultado, em 1970, a Organização mundial da Saúde (OMS) elencaram *S. aureus* como patógenos mais relevantes associados a infecções nosocomiais em diversos países (WHO SCIENTIFIC WORKING GROUP, 1983).

A descoberta e o desenvolvimento de antibacterianos foram, inquestionavelmente, uma história de sucesso do século XX, com uma sucessão de novos produtos sendo introduzidos na prática médica, permitindo que inúmeras vidas fossem salvas (BLACK, 2005; DAVIES; DAVIES, 2010; GILLESPIE, 2022). Entretanto, desde então, a maior ameaça ao uso desses agentes antimicrobianos na terapia de infecções bacterianas tem sido a expressão de resistência aos mesmos, em especial, por bactérias classificadas como patogênicas (MATHUR; SINGH, 2005, MAHONEY, 2023).

O “surgimento” (que, na verdade, significa detecção da propriedade) de resistência aos antimicrobianos é uma resposta natural e inevitável à exposição ao antimicrobiano, explicada pelo processo de seleção descrito por Darwin. Entretanto, a automedicação, a prescrição incorreta, a não adesão ao esquema terapêutico proposto e o mau uso na pecuária, entre outros, são fatores responsáveis por acelerar o processo de seleção de amostras bacterianas resistentes (ECONOMOU; GOUSIA, 2015; HOLMES *et al.*, 2016; KHAN *et al.*, 2017).

Importante mencionar que um único antimicrobiano pode exercer pressão para seleção de amostras resistentes não apenas àquele determinado medicamento, mas, também, pode incluir resistência a outros compostos estruturalmente relacionados. Como exemplo, pode ser citada a tetraciclina e o gene *tet(M)*, que confere resistência, adicionalmente, à oxitetraciclina, clortetraciclina, doxiciclina e minociclina (MATHUR; SINGH, 2005). Já quando antimicrobianos de classes diferentes compartilham o mesmo alvo de ação e este é modificado pelo produto de um gene associado à resistência, é observada resistência cruzada entre fármacos não relacionados estruturalmente, como visto na resistência combinada a macrolídeos, lincosamidas e estreptogamina B, conferida pelos genes *erm* (ROBERTS *et al.*, 1999).

Em janeiro de 2019, a OMS publicou uma lista com as dez maiores ameaças à saúde na atualidade, dentre elas, a resistência a fármacos antimicrobianos. Num dos trechos do documento, observa-se, com clareza, a preocupação com essa temática: “...ameaça nos mandar de volta a uma época em que não conseguíamos tratar facilmente infecções como pneumonia, tuberculose, gonorreia e salmonelose” (*WHO Ten threats to global health in 2019*). Segundo Holmes e colaboradores (2016), os antimicrobianos estão entre os medicamentos mais comumente usados na medicina humana. Entretanto, até 50% das prescrições são consideradas desnecessárias. Estima-se que até o ano de 2050, infecções associadas a microrganismos resistentes a antimicrobianos poderão levar a mais mortes do que qualquer outra causa (O’NEILL, 2014).

O surgimento de microrganismos resistentes a antimicrobianos e sua distribuição em comunidades microbianas por toda biosfera é baseado principalmente em dois fatores, a presença de genes que codificam resistência e a pressão seletiva exercida pelos antimicrobianos (MATHUR; SINGH, 2005; DAVIES; DAVIES, 2010). Esta última desempenha papel fundamental na manutenção de bactérias resistentes. Sempre que uma população bacteriana é exposta a agentes antimicrobianos, é possível que haja bactérias resistentes aos fármacos na concentração aplicada. Sob pressão seletiva, a subpopulação de organismos suscetíveis diminuirá proporcionalmente, enquanto o subgrupo de amostras resistentes se tornará relativamente maior. Ainda, os indivíduos resistentes podem disseminar genes que conferem a propriedade para outros indivíduos da população (MATHUR; SINGH, 2005).

O papel predominante das atividades antropogênicas na geração de reservatórios

ambientais de resistência a fármacos antimicrobianos não pode ser contestado. Desde a década de 1940, quantidades crescentes de antimicrobianos designados para uso em seres humanos vêm sendo fabricadas, usadas clinicamente e liberadas no ambiente, proporcionando, assim, uma pressão constante de seleção e manutenção de populações de bactérias resistentes em todos os ambientes. O uso dos antimicrobianos contempla as mais diversas atividades, sejam para efeito profilático ou terapêutico, em seres humanos e outros animais. São amplamente empregados na promoção de crescimento de animais de criação, no controle de pragas e clonagem de plantas na agricultura, na formulação de produtos de higiene pessoal e na pesquisa, entre outros exemplos (DAVIES; DAVIES, 2010).

A resistência se origina como um fenômeno local, mas pode se expandir para proporções globais. Qualquer problema localizado pode ser transportado com facilidade no mundo moderno, considerando-se o fenômeno da globalização. Hoje, viagens internacionais são corriqueiras e a circulação de indivíduo através das diferentes localidades traz a possibilidade de circulação associada de um conjunto de microrganismos diverso (LEVY, 2001; HAWKEY, 2018).

Talvez, a maior implicação da resistência de microrganismos a fármacos antimicrobianos, aquela que tem efeitos mais graves e imediatos, seja na clínica médica, em especial, nas infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS). As taxas elevadas de resistência a antimicrobianos entre patógenos “nosocomiais” têm sobrecarregado os sistemas de saúde, em decorrência de sua associação com taxas elevadas de morbidade e mortalidade, aumento dos custos de tratamento e limitação das opções terapêuticas. É fundamental que todas as medidas que visem a preservar a eficácia dos antimicrobianos disponíveis sejam adotadas, considerando todas as dificuldades e custos que cercam o processo de desenvolvimento de novos medicamentos (VON WINTERSDORFF *et al.*, 2016; KHAN *et al.*, 2017).

1.1.2 Bases genéticas e bioquímicas da resistência a antimicrobianos

Do ponto de vista genético, a resistência bacteriana a antimicrobianos pode se desenvolver por dois mecanismos básicos, quais sejam mutação e recombinação. A mutação é a única fonte de material genético novo, fundamental para a variabilidade genética. Por outro lado, a recombinação é essencial para amplificação da variabilidade gerada por mutação

(ARENAS *et al.*, 2018).

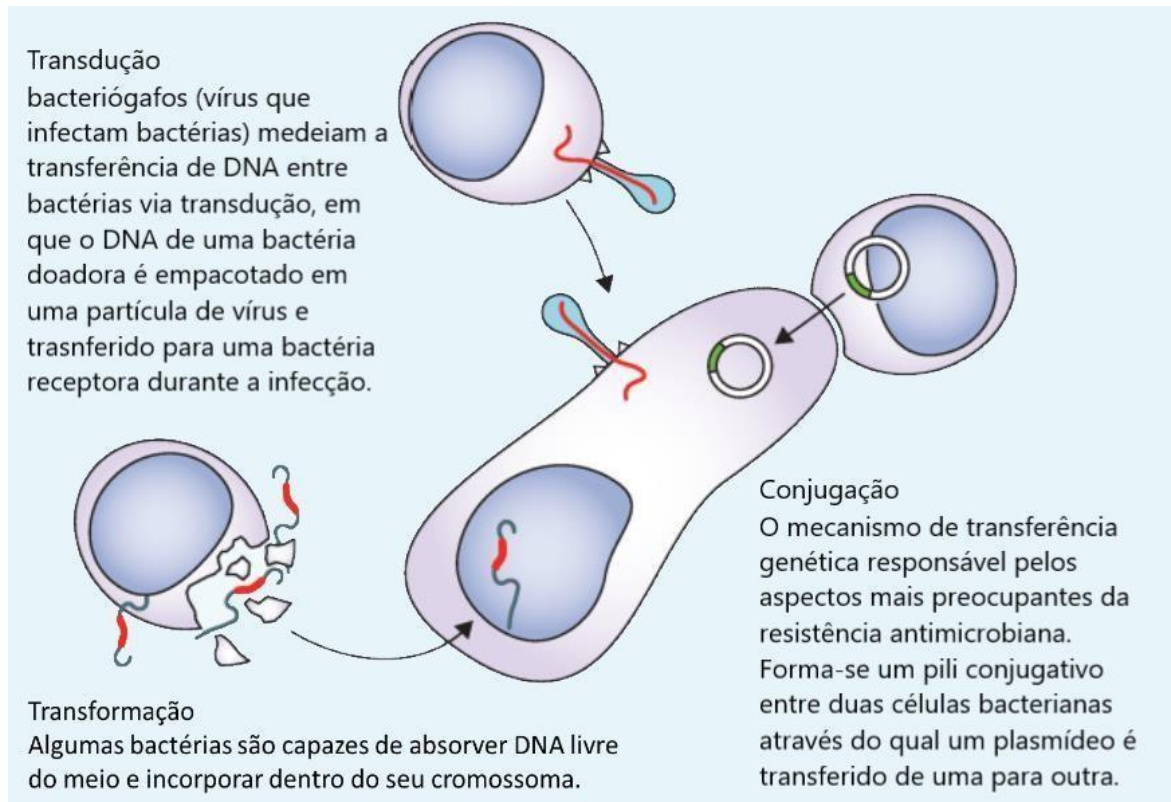
A recombinação genética em bactérias se dá por transferência horizontal de genes. Assim, a resistência a antimicrobianos pode ser disseminada entre indivíduos de uma população pela transferência/captação de DNA, quer seja de fragmentos do cromossomo (mais rara) ou dos chamados elementos genéticos móveis que compõem o mobiloma bacteriano, quais sejam, plasmídeos, transpósons, *integrons*/cassetes gênicos e bacteriófagos. A transferência de material genético via plasmídeos é considerada a mais importante na atual pandemia de microrganismos resistentes a antimicrobianos (SHOUSA *et al.*, 2015; SHARMA *et al.*, 2016; VON WINTERSDORFF *et al.*, 2016; MCMILLAN *et al.*, 2019).

O surgimento de resistência a antimicrobianos relaciona-se a modificações estruturais ou bioquímicas nas células bacterianas. Os mecanismos de resistência incluem, principalmente, inativação/alteração do fármaco, modificação de alvos de ligação dos fármacos, expulsão do fármaco antes que ele atinja seu alvo pela ação de bombas de efluxo e alterações na permeabilidade celular. Também deve ser citada a formação de biofilme, que protege o microrganismo da ação do fármaco antimicrobiano (LEWIS, 2007; SÁNCHEZ, 2015; SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016; SHARMA *et al.*, 2016; VON WINTERSFORFF *et al.*, 2016; ANVISA *et al.*, 2019). Com frequência, bactérias utilizam mais de uma estratégia para evitar a ação dos antimicrobianos e a ação conjunta de múltiplos mecanismos pode produzir um aumento acentuado da resistência (ANVISA, 2007).

1.1.2.1 Recombinação genética em bactérias

O material genético é transferido horizontalmente entre bactérias por três mecanismos (Figura 1): (i) Transformação - certas bactérias são capazes de captar, integrar e expressar funcionalmente fragmentos de DNA exógeno, encontrado livre no ambiente, originado de amostras doadoras previamente mortas; (ii) Conjugação - transferência de DNA através do contato célula-célula, por meio do *pili* ou de adesinas da superfície celular; e (iii) Transdução - o transporte do DNA da célula doadora para a célula receptora ocorre por meio de bacteriófagos. Todos os processos de recombinação gênica mencionados são raros, mas, fundamentais para amplificação de variabilidade genética entre bactérias. Entre eles, o mais relevante é a conjugação (HOLMES *et al.*, 2016; VON WINTERSDORFF *et al.*, 2016; MAHONEY, 2023).

Figura 1: Recombinação genética bacteriana



Fonte: modificado de HOLMES *et al.*, 2016.

1.1.2.2 Plasmídeos

Os plasmídeos são moléculas de DNA extra cromossomal capazes de se reproduzir independente do DNA cromossômico. Com frequência, carregam genes que conferem vantagem seletiva às bactérias em condições de estresse, em especial, associados à resistência a fármacos antimicrobianos. Já foram descritos genes plasmidiais que conferem resistência às principais classes de antimicrobianos, incluindo β -lactâmicos, macrolídeos, quinolonas, aminoglicosídeos, tetraciclina, cloranfenicol e sulfonamidas (CARATTOLI, 2013; MATHERS *et al.*, 2015).

Os plasmídeos replicam-se de forma autônoma, ou seja, independente do cromossomo. Assim, podem ser transmitidos tanto da célula mãe para as células filhas, como entre indivíduos de uma mesma geração. Desta forma, disseminam-se numa determinada

população bacteriana com mais eficiência (PARTRIDGE *et al.*, 2018).

Além desta maior facilidade de disseminação, os plasmídeos são importantes veículos que carregam outros elementos genéticos móveis, quais sejam transpósons e *integrons*, que também podem estar associados a resistência aos antimicrobianos. Esta propriedade confere aos plasmídeos uma relevância ainda maior na disseminação de características entre membros de uma determinada população bacteriana (CARATTOLI, 2013; PARTRIDGE *et al.*, 2018). Por esta razão, os plasmídeos têm desempenhado papel primordial no aumento global da resistência bacteriana a fármacos antimicrobianos (CARATTOLI, 2013; MATHERS *et al.*, 2015).

Adicionalmente, muitas vezes, vários determinantes genéticos que conferem resistência a diferentes classes de antimicrobianos podem ser identificados no mesmo plasmídeo, dando uma vantagem seletiva ainda maior à bactéria em situações de exposição a múltiplos fármacos antimicrobianos (CARATTOLI, 2013). Conseqüentemente, um único evento de transferência de plasmídeo pode transformar uma bactéria sensível em resistente a vários antimicrobianos, o que tem implicações graves para a área de saúde. Considera-se como multirresistente um microrganismo que apresenta resistência a pelo menos um fármaco de três classes de antimicrobianos diferentes simultaneamente (EBRAHIMPOUR *et al.*, 2018). Ao serem transferidos, os plasmídeos que carregam múltiplos genes associados a resistência aos antimicrobianos, geralmente, não são mantidos de forma estável. Entretanto, essa instabilidade pode ser superada pela pressão seletiva imposta pelos antimicrobianos (RIDENHOUR *et al.*, 2017).

1.1.2.3 Sistema *integrons*/cassetes gênicos

O termo *integron* foi proposto em 1989, por Stokes e Hall, para descrever o grupo de elementos móveis que continha um ou mais genes associados à resistência a antimicrobianos localizados em um sítio específico, além de conter os determinantes de recombinação sítio-específica responsáveis pela inserção de genes de resistência (PAGANO, 2012).

Integron é definido como um sistema específico de elementos genéticos que permite a captura de um único ou múltiplos cassetes móveis de genes exógenos que, dentre outras funções, conferem resistência a antimicrobianos (CHEN *et al.*, 2015; GHALY *et al.*,

2019). É caracterizado pela presença de *intl*, gene que codifica uma integrase, um sítio de recombinação (*attI*) e um promotor e pode estar localizado em plasmídeo, cromossomo ou transpósom (XIA *et al.*, 2016). Os cassetes gênicos se movem por um mecanismo conservador de recombinação sítio-específica que é catalisada pela integrase (HANSSON *et al.*, 2002). Os *integrons* são elementos genéticos considerados sistemas naturais de clonagem e expressão gênica, capazes de incorporar ORFs (*open reading frames*), tornando-as genes funcionais, logo, favorecendo a aquisição e a incorporação de genes de resistência no genoma bacteriano (CLÍMACO, 2011).

Os *integrons* contendo cassetes gênicos parecem ser ubíquos, tendo sido recuperados de vários ambientes, incluindo sedimentos de solo e aquáticos, microbiota de plantas e animais, biofilmes aquáticos, água do mar e fontes hidrotermais de águas profundas (GHALY *et al.*, 2019).

Por meio de mecanismos de recombinação bacteriana, os *integrons* podem ser transferidos entre amostras bacterianas, disseminando, por exemplo, genes que codificam resistência a fármacos antimicrobianos (XIA *et al.*, 2016). A transferência interbacteriana de *integrons* se dá, principalmente, via plasmídeos (CARVALHO, 2013). Um *integron* é capaz de transportar genes de resistência a uma ou mais classes de antimicrobianos e, então, qualquer uma delas pode selecionar a favor da presença do elemento (LUIZ, 2006).

Os *integrons* podem ser divididos em dois grandes grupos: *integrons* de resistência (RI), que carregam a maioria dos cassetes gênicos que codificam resistência a agentes antimicrobianos e desinfetantes e se localizam em plasmídeos ou cromossomo, e os super-*integrons* (SI), presentes, principalmente, em amostras ambientais (FLUIT e SCHMITZ, 2004).

Até o momento, cinco classes de *integrons* foram descritas, mas apenas as classes 1, 2 e 3 são reconhecidas pelo seu papel na disseminação de genes associados a resistência a antimicrobianos (PAGANO *et al.*, 2016; NOVOVIC *et al.*, 2019). Os *integrons* de classe 1 são os mais relevantes do ponto de vista clínico, com uma ampla distribuição entre os gêneros *Acinetobacter*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Proteus*, *Burkholderia*, *Alcaligenes*, *Campylobacter*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Salmonella*, *Shigella* e *Escherichia*. *Integrons* de classe 2 foram observados em *Acinetobacter*, *Aeromonas* e *Enterobacteriaceae* e *integrons* de classe 3 foram encontrados

em *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* e *Enterobacteriaceae* (MOHAMED *et al.*, 2016). Os *integrans* de classe 4 foram detectados, principalmente, em *Vibrio cholerae* e, finalmente, os de classe 5, foram detectados em plasmídeo de *Alivibrio salmonicida* (PORMOHAMMAD *et al.*, 2019).

Além de estarem associados com resistência a fármacos antimicrobianos, os *integrans* presentes em bactérias encontradas em ambientes naturais podem expressar genes relacionados à adaptação a diferentes pressões ambientais. Um único *integron* pode conter diversos genes de adaptação que podem ser mobilizados, reorganizados e disseminados entre as bactérias e, conseqüentemente, desempenham papel relevante na evolução do genoma bacteriano e na adaptação dos microrganismos às pressões do ambiente (ABELLA *et al.*, 2015).

1.1.2.4 Bombas de efluxo

Promover o efluxo do fármaco antimicrobiano é um dos mecanismos mais importantes de resistência a antimicrobianos. As bombas de efluxo podem conferir resistência simultânea a diferentes classes de antimicrobianos, o que potencializa seu impacto no fenótipo de resistência. Apresentam, geralmente, três componentes, quais sejam, a própria bomba, uma proteína ligadora e uma proteína de membrana que age como porta de saída. O papel natural do sistema de efluxo é remover produtos químicos que poderiam desestruturar a membrana citoplasmática das bactérias (BONOMO e SZABO, 2006; MAHONEY, 2023). Sendo assim, essas bombas multicomponentes medeiam, por meio de uma troca acoplada de prótons, o efluxo de compostos tóxicos para fora da célula bacteriana, incluindo várias classes de antimicrobianos, como β -lactâmicos, quinolonas, macrolídeos e aminoglicosídeos (PEREZ *et al.*, 2007).

Foram identificadas seis famílias distintas de bombas de efluxo, encontradas em várias espécies bacterianas: a família de extrusão de compostos tóxicos e de multidrogas (MATE), a superfamília ATP *binding cassette* (ABC), a principal superfamília facilitadora (MFS), a família resistência-nodulação-divisão (RND), a família de baixa resistência a multidrogas (SMR) e a mais recentemente descrita, nomeada efluxo de compostos antimicrobianos de proteobactérias (PACE) (PEREZ *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2016).

A concentração inibitória mínima (CIM) de antimicrobianos é alterada pela superprodução da bomba de efluxo AcrAB-TolC, levando ao aumento da concentração do antimicrobiano necessário ao efeito inibitório requerido (PUZARI; CHETIA, 2017). Além disso, estas bombas, juntamente com outros transportadores, contribuem para a resistência das bactérias à maioria dos compostos disponíveis no nosso arsenal antimicrobiano (VARGIU *et al.*, 2016).

Em geral, as bombas de efluxo relacionadas à extrusão de antimicrobianos são codificadas por genes presentes em transpósons e plasmídeos, ao passo que as bombas de efluxo relacionadas à expulsão de outras substâncias são codificadas por genes localizados no cromossomo bacteriano (PUZARI; CHETIA, 2017).

1.2 Microrganismos de relevância clínica

1.2.1 ESKAPE

O número crescente de patógenos resistentes a fármacos antimicrobianos associados às IRAS sobrecarrega significativamente os sistemas de saúde, acarretando em taxas elevadas de morbidade e mortalidade, atraso no diagnóstico, falhas na antibioticoterapia e aumento dos custos. Em especial, merece destaque um grupo de organismos considerados paradigmas de patogênese, transmissão e resistência aos antimicrobianos. ESKAPE é um acrônimo para este grupo de patógenos, cujo controle é o maior desafio para a área de saúde. São incluídas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, quais sejam, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* e *Enterobacter* spp. (JADIMURTHY *et al.*, 2022; RICE, 2008). Atualmente alguns autores acrescentaram a esse grupo de bactérias a espécie *E. coli* (ESKAPE-E), visto sua relevância clínica por se caracterizar como uma ameaça global à saúde com necessidade de novas pesquisas e desenvolvimento de novos antimicrobianos para combatê-la, sendo o (AYOBAMI *et al.*, 2022; TACCONELLI *et al.*, 2018).

Os patógenos ESKAPE frequentemente desafiam os profissionais da área clínica, criando sérios dilemas terapêuticos, devido aos perfis extensos e complexos de resistência a antimicrobianos. Dado que esses agentes são responsáveis pela maior parte da resistência a antimicrobianos observada no cenário hospitalar, a vigilância epidemiológica, que possibilita a

descrição dos perfis de resistência desses organismos, fornece um importante indicador dos perfis de resistência a antimicrobianos regionais encontrados nos ambientes relacionados à assistência à saúde (KARLOWSKY *et al.*, 2017; MULANI *et al.*, 2019; DEVANEY; SCOTT, 2022). Cerca de dois terços de todas as infecções associadas à assistência médica estão relacionadas a membros do grupo ESKAPE e muitas dessas bactérias expressam múltiplos mecanismos de resistência a fármacos antimicrobianos (DU *et al.*, 2017).

1.2.2 Bastonetes Gram-negativos não fermentadores

1.2.2.1 Características gerais

Os bastonetes Gram-negativos não fermentadores (BGNNF) constituem um grupo heterogêneo de microrganismos aeróbios, que se caracterizam pelo fato de serem incapazes de utilizar carboidratos como fonte de energia por meio de fermentação. Alguns membros do grupo são sacarolíticos, sendo capazes de utilizar carboidratos por via oxidativa (DELIBERALI *et al.*, 2011; PEREIRA *et al.*, 2012).

O grupo está amplamente distribuído no ambiente e permanece viável por períodos prolongados. Quando encontrado em ambientes hospitalares, são considerados patógenos em potencial, em função da sua capacidade de se multiplicar e persistir em superfícies inanimadas por longos períodos (PEREIRA *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2015).

As infecções por BGNNF ganharam importância em instituições hospitalares a partir da década de 1970. Os organismos estão ligados a infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), principalmente em unidades de terapia intensiva (UTIs), unidades de queimados e em pacientes submetidos a procedimentos invasivos que utilizam agentes antimicrobianos de amplo espectro e imunocomprometidos (ANVISA, 2008; DELIBERALI *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2015).

Os BGNNFs estão entre as bactérias de maior relevância clínica e epidemiológica, porém o diagnóstico fenotípico não é fácil. Ao contrário, a identificação dos membros do grupo representa um desafio para os laboratórios de microbiologia clínica, sendo bastante cara e laboriosa. Alguns dos testes empregados para identificação presuntiva desse grupo são reação da oxidase, produção de pigmentos, multiplicação em Ágar MacConkey, odor, produção de DNase e multiplicação a 42°C (PEREIRA *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2017).

Mais de 120 espécies de BGNNF foram classificadas como patogênicas, destacando-se, entre elas *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Burkholderia cepacia* (ANVISA, 2008; PEREIRA *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2017). Sendo responsáveis por causar, principalmente, infecções do trato respiratório, em especial, em pacientes com fibrose cística. Essas bactérias exibem resistência a uma ampla variedade de antimicrobianos, incluindo penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos, aminoglicosídeos, tetraciclina, fluoroquinolonas, trimetropim-sulfametoxazol e polimixinas, sendo este último amplamente utilizado no tratamento de pacientes com infecções associadas a *P. aeruginosa* e *A. baumannii* (SILVA *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2017).

1.2.2.2 *Acinetobacter baumannii*

A designação atual do gênero *Acinetobacter* refere-se ao conceito grego “*Akinetos*”, introduzido em 1954 por Brisou e Prévot, que significa “não móvel”. Apesar desse gênero ainda ser descrito como um microrganismo não móvel, a maioria das linhagens exibe uma motilidade “espasmótica”, ou seja, conseguem se mover por superfícies semissólidas por meio de movimentos contráteis. Esse fenômeno é apoiado pela observação de que a motilidade exibida por *A. baumannii* é afetada à medida que a concentração de ágar ou agarose no meio aumenta (MCCONNELL; PACHÓN, 2013; VÁSQUEZ-LÓPEZ *et al.* 2020).

A. baumannii é um dos BGNNFs mais relevantes do ponto de vista clínico. A bactéria apresenta-se, geralmente, como um cocobacilo não fastidioso, catalase positivo, oxidase negativo, com temperatura ótima de multiplicação de 37°C (MICHIELS *et al.*, 2016; JUTTUKONDA *et al.*, 2019).

1.2.2.2.1 Epidemiologia

A. baumannii é responsável, principalmente, por causar pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV), infecção do trato urinário e bacteremia, mas também está associado, menos frequentemente, a infecções do sistema nervoso central e infecções de pele e tecidos moles (PEREZ *et al.*, 2007; BARTHOLOMEW *et al.*, 2019).

Destaca-se, essencialmente, pela sua habilidade de sobreviver por períodos prolongados sob uma ampla gama de condições ambientais, fato este que potencializa a sua disseminação em ambiente hospitalar (ELIOPOULOS *et al.*, 2008). É um microrganismo oportunista, que acomete, em especial, indivíduos imunocomprometidos, representando uma das principais bactérias causadores de IRAS, principalmente em UTIs (BIGOT; SALCEDO, 2017; MOYNIÉ *et al.*, 2017; ISLER *et al.*, 2018). Apesar das infecções causadas por *A. baumannii* serem predominantemente nosocomiais, casos de infecções adquiridas na comunidade vêm sendo descritos (RAMIREZ *et al.*, 2020).

Segundo Nie e colaboradores (2020), cerca de 1.000.000 de pessoas em todo o mundo são infectadas por *A. baumannii* todos os anos e metade dos casos envolve amostras multidroga resistentes (MDR). A taxa de mortalidade de infecções causadas por *A. baumannii* em pacientes em UTIs é de cerca de 45 a 60%, chegando a mais de 84% quando os pacientes são infectados por amostras multirresistentes da bactéria.

1.2.2.2.2 Patogenicidade

O fato de *A. baumannii* conseguir se adaptar ao ambiente nosocomial, resistir a desafios e possuir um conjunto conservado de genes de patogenicidade regulado diferencialmente de acordo com a linhagem é importante para a patogenicidade da espécie (ANTUNES *et al.*, 2014). A patogenicidade bacteriana está intimamente relacionada à capacidade de usar estratégias específicas de aquisição de ferro que são essenciais para a sobrevivência e crescimento do patógeno, uma vez que este compete com as células hospedeiras por este elemento (VÁSQUEZ-LÓPEZ *et al.*, 2020).

As proteínas de membrana externa (OMPs) são um fator de patogenicidade importante em *A. baumannii*, pois desempenham papéis fundamentais na regulação da adesão e agressividade da resposta imune do hospedeiro, além de estarem associadas à formação de biofilme (NIE, *et al.*, 2020). Esta bactéria tem a capacidade de formar biofilme em uma ampla gama de superfícies, tanto abióticas, como aço inoxidável e polipropileno, bem como células epiteliais hospedeiras. Muitos fatores de patogenicidade têm sido implicados na aderência das células bacterianas, como a proteína associada ao biofilme (Bap), que é necessária para a adesão às células brônquicas e integridade estrutural e formação de canais de água dentro do biofilme. Também estão envolvidos nesse processo os *pili* do tipo IV e Cup,

além dos óperons *pap* e *prp* (MCCONNELL *et al.*, 2013; COLQUHOM e RATHER, 2020, VÁSQUEZ- LÓPEZ *et al.*, 2020).

O lipopolissacarídeo (LPS), componente da parede celular bacteriana, juntamente com os *pili* são importantes na etapa de colonização, pois são responsáveis por promover aderência às células hospedeiras. Além disso, *A. baumannii* pode produzir uma cápsula ao redor da superfície bacteriana que cria uma barreira contra fatores ambientais que prejudicariam o microrganismo, como a desinfecção e a fagocitose (MOUBARECK; HALAT, 2020; RAMIRÉZ *et al.*, 2020).

Fosfolipases são fatores de patogenicidade adicionais presentes em *A. baumannii*. Essas enzimas possuem atividade lipolítica, atuando em fosfolípidos das membranas celulares humanas (MOUBARECK; HALAT, 2020; VASQUÉZ- LÓPEZ *et al.*, 2020).

1.2.2.2.3 Suscetibilidade de *A. baumannii* a antimicrobianos

Em geral, como mencionado anteriormente, os mecanismos de resistência a fármacos antimicrobianos incluem baixa permeabilidade da membrana externa, modificações locais do alvo de ação do antimicrobiano, como a alternância de PBPs, síntese de enzimas inativadoras de medicamentos (por exemplo, β - lactamases) e bombas de efluxo (NOWAK *et al.*, 2012). *A. baumannii* apresenta resistência intrínseca e adquirida a diversos antimicrobianos, incluindo os carbapenêmicos, que são os fármacos de escolha no tratamento de pacientes com infecções graves, devido ao seu amplo espectro de atividade e estabilidade à hidrólise pela maioria das β -lactamases (POIREL e NORDMANN, 2006; PEREZ *et al.*, 2007; ROCA *et al.*, 2012; BAPTISTA, 2013; TRINH *et al.*, 2018). A resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii* deve-se, principalmente, à produção de carbapenemases, especialmente as β -lactamases do tipo OXA (classe D de Ambler; Ambler, 1980), que podem ser codificadas por genes localizadas em cromossomos, como *blaOXA-51*. O marcador, intrínseco da bactéria confere resistência a carbapenêmicos quando um elemento ISAbal é inserido a montante do gene. Outros marcadores também podem ser adquiridos, como *blaOXA-23*, *blaOXA-48*, *blaOXA-58* e *blaOXA-143* (NOWAK *et al.*, 2012; ABD EL-BAKY *et al.*, 2020; KANAPATHY *et al.*, 2022).

Os genes que codificam a síntese de M β LS (metallo- β -lactamases), que são β -

lactamases de classe B (Ambler, 1980), capazes de hidrolisar todos os β -lactâmicos, com exceção dos monobactâmicos (NOWAK *et al.*, 2012;), podem ter localização plasmidial ou cromossômica. As enzimas M β LS mais comuns pertencem às famílias IMP, VIM, SIM, KPC, GIM e o grupo NDM (New Dheli metallo- betalactamase), sendo este último de grande importância clínica, pois codifica as M β LS mais potentes (YOUNG *et al.*, 2009; NOWAK *et al.*, 2012; KAUSHIK *et al.*, 2019; PAGANO *et al.*, 2016).

As β -lactamases de espectro estendido (ES β LS) pertencem a classe A de Ambler e são responsáveis por hidrolisar cefalosporinas de primeira, segunda e terceira gerações e penicilinas. Em *A. baumannii*, os genes associados à síntese de ES β LS identificados são principalmente dos tipos VEB e PER, mas, também foram relatados TEM, GES e CTX-M (PEREZ *et al.*, 2007; NOWAK *et al.*, 2012; TADA *et al.*, 2017).

Várias enzimas AmpC (β -lactamases da classe C), capazes de hidrolisar eficientemente penicilinas e a maioria das cefalosporinas de amplo espectro, foram identificadas em *A. baumannii* (PEREZ *et al.*, 2007; PELEG *et al.*, 2008; ZAVASCKI *et al.*, 2010).

Relativo a aminoglicosídeos, a resistência de *A. baumannii* é resultado da aquisição de genes localizados em plasmídeos e transpósons, que codificam enzimas modificadoras específicas (AMEs), que inativam os antimicrobianos desta classe, além da atuação de bombas de efluxo (MAGNET *et al.*, 2001; NEMEC *et al.*, 2004; PEREZ *et al.*, 2007, TRINH *et al.*, 2018). A resistência às quinolonas pode estar associada a bombas de efluxo ou modificações nos genes *gyrA* e *parC* que alteram a estrutura da DNA girase, resultando numa menor afinidade para ligação da quinolona ao complexo enzima-DNA (PEREZ *et al.*, 2007). A resistência de *A. baumannii* às tetraciclinas, descrita por Perez e colaboradores (2007), deve-se a duas bombas de efluxo (TetA e TetB), codificadas por genes localizados em transpósons específicos. TetB é responsável pelo efluxo de minociclina e tetraciclina, enquanto que TetA impulsiona o efluxo apenas de tetraciclina. Já o mecanismo de resistência à colistina está associado a *pmrA* e *pmrB*, que modificam o LPS, interferindo na ligação do antimicrobiano à parede celular (PEREZ *et al.*, 2007; ROCA *et al.*, 2012; JAYOL *et al.*, 2018).

Em decorrência do amplo perfil de resistência a antimicrobianos, a prescrição de alguns fármacos de uso restrito, vem sendo necessária em algumas situações

(BARTHOLOMEW *et al.*, 2019). Antimicrobianos antigos, como fosfomicina e polimixinas, agora são considerados possíveis alternativas terapêuticas para suprir a falta de novos fármacos. Estudos demonstraram que a fosfomicina é um fármaco promissor, particularmente em combinação com outros antimicrobianos, para o tratamento de pacientes infectados por bastonetes Gram- negativos multirresistentes. No entanto, *A. baumannii* apresenta resistência intrínseca à fosfomicina. Por outro lado, as polimixinas B e E (colistina) são, geralmente, ativas contra amostras multirresistentes do microrganismo e, atualmente, têm sido empregadas como último recurso terapêutico (LEITE *et al.*, 2016; REBELO *et al.*, 2018).

A colistina pertence à classe antimicrobiana designada polimixinas, sintetizadas pela bactéria *Paenibacillus polymyxa*. Essa classe inclui as polimixinas A, B, C, D e E, das quais apenas colistina (polimixina E) e polimixina B são utilizadas na prática clínica (REBELO *et al.*, 2018). Com a dependência do uso da colistina para tratar pacientes com infecções associadas a amostras resistentes aos demais antimicrobianos, nos últimos anos, a detecção de *A. baumannii* resistente ao fármaco tem sido relatada (LEITE *et al.*, 2016). A resistência adquirida à colistina é mediada, principalmente, por mutações cromossômicas que resultam em alterações na membrana externa bacteriana. A resistência mediada por plasmídeo está associada aos genes *mcr*, que codificam fosfoetanolamino transferases (enzimas MCR) que alteram o lipídeo A, constituinte do LPS, reduzindo, assim, a ligação da colistina e, portanto, evitando a lise celular. Atualmente, nove genes *mcr* foram identificados (*mcr-1* a *mcr-9*). Eles são, frequentemente, transportados em plasmídeos em enterobactérias, sendo *mcr-1* o gene mais comumente observado em *A. baumannii*. Recentemente, *mcr-4.3* foi identificado em amostras da espécie isoladas de fezes de porco, na China (REBELO *et al.*, 2018; MARTINS-SORENSEN *et al.*, 2020).

Em particular, a ameaça à saúde humana no nível global, decorrente do aumento das taxas de infecção por amostras produtoras de carbapenemases, levou a OMS a listar *A. baumannii* resistente a carbapenêmicos como prioridade “crítica” para o desenvolvimento de novos antimicrobianos. Portanto, pesquisas que investigam mecanismos pelos quais essa bactéria se adapta tão facilmente a hospedeiros e ambientes são urgentemente necessárias, como uma estratégia para identificar novos alvos para intervenção terapêutica (JUTTUKONDA *et al.*, 2019).

1.2.2.3 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa, considerada, por muito tempo, como uma bactéria aeróbia, é, hoje, amplamente reconhecida como altamente adaptada a condições anaeróbicas. É um BGNNF monoflagelado e quimioheterotrófico (PEREIRA *et al.*, 2014). A bactéria, à semelhança de *A. baumannii*, é um agente frequentemente associado a IRAS, capaz de sobreviver em condições diversas, sendo isolada de ambientes tais como solo, pântano, habitats marinhos costeiros, tecidos vegetais e animais (STOVER *et al.*, 2000; ARTINI *et al.*, 2018). Sua capacidade de prosperar em diversos ambientes com diferentes disponibilidades de nutrientes e oxigênio está relacionada com a sua atividade metabólica e potencial adaptativo a ecossistemas com baixos níveis desses elementos (PEREIRA *et al.*, 2014; LUND-PALAU *et al.*, 2016). É considerado o representante clinicamente mais importante do gênero *Pseudomonas*, podendo causar doenças em plantas e animais, inclusive, no ser humano (KHOSRAVI *et al.*, 2017; ARTINI *et al.*, 2018).

1.2.2.3.1 Epidemiologia

P. aeruginosa é considerada um patógeno oportunista que causa infecções nosocomiais graves, isto é, infecções relacionadas com o internamento em um estabelecimento de saúde com taxas elevadas de morbidade e mortalidade (KHOSRAVI *et al.*, 2017). Os pacientes são infectados através de uma fonte exógena, como por contato direto ou indireto com o ambiente (SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016). As principais infecções relacionadas a essa bactéria incluem bacteremia em vítimas de queimaduras, pneumonia em pacientes em uso de respiradores, infecção do trato urinário em pacientes cateterizados e infecção de tecidos moles. A espécie é frequentemente isolada de pacientes imunocomprometidos que foram submetidos a transplante de órgãos, procedimentos invasivos, terapia imunossupressora ou terapia intensiva, assim como é comumente observada em pacientes com fibrose cística, cujos epitélios anormais das vias aéreas permitem a colonização dos pulmões por longos períodos de tempo, e feridas crônicas. Nestes casos, a infecção é mais complexa, uma vez que o estado crônico está associado a adaptações fenotípicas e genotípicas, incluindo a transição para um fenótipo mucoide, redução de mobilidade respiratória, formação de biofilmes e elevadas taxas de resistência a antibióticos (STOVER *et al.*, 2000; MULCAHY *et al.*, 2014; HONG *et al.*, 2015; ARTINI *et al.*, 2018).

1.2.2.3.2 Patogenicidade

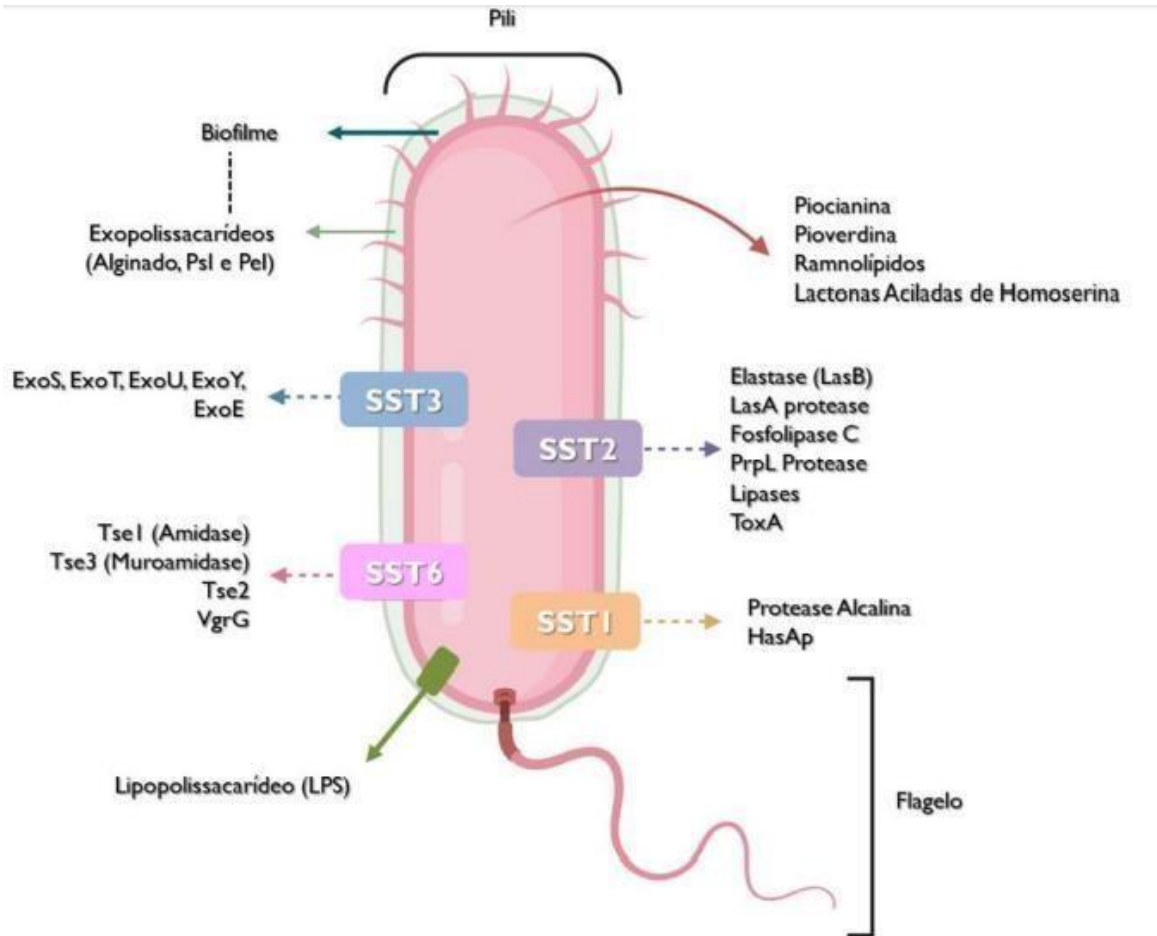
P. aeruginosa exibe um conjunto de habilidades, próprias da sua natureza, que contribuem para a proteção da bactéria frente a outros organismos presentes nos mesmos ambientes, como solo e água. Entre elas, algumas agem como fatores de patogenicidade (PARSEK; GREENBERG, 2000; PEREIRA *et al.*, 2015).

Dentre os diversos fatores de patogenicidade que podem ser expressos por *P. aeruginosa* (Figura 2), pode-se destacar estruturas de superfície, sistemas de secreção e produtos secretados, formação de biofilme e o sistema de sinalização *quorum sensing* (STOVER *et al.*, 2000; TAVARES, 2002; KHOSRAVI *et al.*, 2017).

No que se refere às estruturas de superfície, devem ser mencionados LPS, flagelo e *pili* tipo IV. As estruturas de motilidade, flagelo e *pili*, permitem a locomoção e adesão da bactéria à célula do hospedeiro. O LPS, por outro lado, interfere na cascata de coagulação do hospedeiro, causando leucopenia (BREIDENSTEIN *et al.*, 2011; PEREIRA *et al.*, 2015; LUND-PALAU *et al.*, 2016).

Da ampla gama de produtos que *P. aeruginosa* é capaz de secretar, pode-se destacar as proteases (principalmente protease alcalina e elastase), capazes de degradar a elastina (representa 28% do tecido pulmonar) e ainda clivar imunoglobulinas e proteínas surfactantes A e D, comprometendo a imunidade do hospedeiro (DRISCOLL *et al.*, 2007; PEREIRA *et al.*, 2015; LUND-PALAU *et al.*, 2016). Além disso, este microrganismo secreta metabólitos secundários, piocianina e pioverdina, que atuam no epitélio do hospedeiro. A piocianina (responsável pela pigmentação azul-esverdeada da bactéria) expõe as células do hospedeiro a um elevado nível de estresse oxidativo, enquanto que a pioverdina (sideróforo fluorescente) é responsável pela aquisição de ferro (RUMBAUGH *et al.*, 2000; PEREIRA *et al.*, 2015).

Figura 2 Ilustração esquemática de *Pseudomonas aeruginosa* e dos seus principais fatores de virulência



Legenda: **SST1**: Sistema de Secreção I; **SST2**: Sistema de Secreção 2;

SST3: Sistema de Secreção 3; **SST6**: Sistema de Secreção 6.

Fonte: TAVARES, A. B. T., 2020.

Dentre os sistemas de secreção observados em *P. aeruginosa*, pode-se destacar o sistema de secreção tipo 3 (SST3). Seu papel está associado à geração de uma resposta imune alterada ou à morte celular, por meio de proteínas efetoras (ExoS, ExoT, ExoY e ExoU) que são liberadas e injetadas nas células hospedeiras. Outro sistema que também se revela importante é o sistema de secreção do tipo 6 (SST6), capaz de eliminar outras bactérias Gram-negativas, fazendo com que *P. aeruginosa* possa competir, de forma mais eficiente, com outras espécies, no caso de infecções polimicrobianas (DRISCOLL *et al.*, 2007; PEREIRA *et al.*, 2014; LUND-PALAU *et al.*, 2016).

Uma característica bastante relevante, que contribui para a importância clínica de *P. aeruginosa*, é sua capacidade de formar biofilme, especialmente em superfícies úmidas em ambiente hospitalar (STOVER *et al.*, 2000; TSENG *et al.*, 2018). Uma vez firmemente estabelecido, o biofilme é mais dificilmente eliminado, considerando que as bactérias estão protegidas por uma matriz polimérica autoproduzida, o que dificulta a ação de agentes antimicrobianos convencionais e células de defesa do sistema imunológico, favorecendo a instalação de infecções crônicas (STOVER *et al.*, 2000; ARTINI *et al.*, 2018).

Segundo Bandara e colaboradores (2020), o sistema de sinalização denominado *quorum sensing* é definido como uma expressão gênica coordenada, dependente da densidade celular, em comunidades microbianas, em resposta a concentrações de moléculas de sinalização química específicas (moléculas de *quorum sensing*, QSMs), levando a uma resposta sincronizada da população. O controle de biofilmes, motilidade, esporulação bacteriana e transferência de plasmídeo conjugativo, dentre outros, são regulados por esse sistema, possibilitando que o microrganismo otimize sua sobrevivência em ambientes dinâmicos e desafiadores (BANDARA *et al.*, 2020; TAVARES *et al.*, 2020). *P. aeruginosa* secreta várias QSMs, como 4-hidroxi-2-heptilquinolina (HHQ), 2-heptil-3,4-dihidroxiquinolina e piocianina, que também são consideradas fatores de patogenicidade, pois exibem capacidade de permear as membranas celulares, afetando diretamente a função ciliar das células respiratórias, além das células do sistema urinário e vascular, podendo prejudicar também o sistema nervoso central (BURGOYNE *et al.*, 2020).

1.2.2.3.3 Suscetibilidade de *P. aeruginosa* a antimicrobianos

A relevância de *P. aeruginosa* como patógeno na medicina humana, reconhecida durante o século passado, está associada à sua resistência a fármacos antimicrobianos, antissépticos e desinfetantes (STOVER *et al.*, 2000). A espécie é conhecida por sua resistência intrínseca a diversos antimicrobianos de linha de frente, devido, principalmente, à baixa permeabilidade de sua membrana externa, superexpressão do sistema de bomba de efluxo e modificações enzimáticas de antimicrobianos, por exemplo, produção de β -lactamases. *P. aeruginosa* resistente a múltiplos antimicrobianos desperta grande preocupação na área de saúde pública em nível mundial (EBRAHIMPOUR *et al.*, 2018).

P. aeruginosa apresenta, com frequência, resistência, tanto cromossômica como

plasmidial, a inúmeros fármacos antimicrobianos. Como já mencionado, a aquisição de genes de resistência por transferência horizontal mediada por elementos genéticos móveis, tais como plasmídeos, transpósons e *integrons*, desempenha um papel crucial (EBRAHIMPOUR *et al.*, 2018; NOVOVIC *et al.*, 2019). No que se refere aos *integrons*, aqueles de classe 1 são os mais prevalentes em diferentes ambientes, inclusive águas residuais (EBRAHIMPOUR *et al.*, 2018). Em especial, destaca-se a presença de marcadores associados à resistência a fármacos β -lactâmicos, como expressão de carbapenemases e ES β LS, o que tem resultado em opções limitadas de tratamento durante as últimas décadas (OLIVER *et al.*, 2015; EBRAHIMPOUR *et al.*, 2018; XU *et al.*, 2018; AMOUDIZAJ *et al.*, 2019).

Os antimicrobianos β -lactâmicos penetram nas células bacterianas através de proteínas de membrana externa chamadas porinas, sendo consideradas uma opção relativamente segura para a terapêutica (SALEEM e BOKHARI, 2020). *P. aeruginosa* exibe resistência a essa classe de fármacos por três mecanismos diferentes: resistência intrínseca, resistência adquirida e resistência adaptativa (RUPPÉ *et al.*, 2015; XU *et al.*, 2018; SALEEM; BOKHARI, 2020). Os carbapenêmicos pertencem a classe de β -lactâmicos que possuem amplo espectro e forte atividade antimicrobiana e são amplamente utilizados contra *P. aeruginosa*. A maioria dos genes que codificam M β LS é plasmidial, o que facilita sua disseminação. Vários tipos de M β LS como IMP, VIM, GIM, SPM, SIM, NDM-1, FIM e KPC tem sido relatados em *P. aeruginosa* (LEITE *et al.*, 2016; XU *et al.*, 2020). As enzimas específicas de *Pseudomonas* (PSEs) também são β -lactamases e, entre elas, as carbenicilinas (CARB) são detectadas com maior frequência (Ambler A; Ambler, 1980). O grupo de enzimas é capaz de hidrolisar a carbenicilina e conferir resistência as carboxifenilinas, ureidopenicilinas e cefsulodina. Em *P. aeruginosa*, são encontradas mais comumente PSE-1 (CARB-2), PSE-4 (CARB-1), CARB-3 e CARB-4 (BERT *et al.*, 2002; ROCHA *et al.*, 2019).

Outras β -lactamases produzidas por *P. aeruginosa* são as ES β LS, enzimas codificadas por plasmídeo, que atuam contra penicilinas e cefalosporinas, como cefotaxima, ceftriaxona e ceftazidima. A resistência em *P. aeruginosa* está associada, na maioria dos casos, à superprodução de AmpC. No entanto, um número crescente de ES β LS classe A de (Ambler), M β LS classe B e oxacilinas de espectro estendido classe D (OXAs) tem sido relatado em amostras clínicas da bactéria. ES β LS classe A já relatadas para *P. aeruginosa* incluem os tipos PER, SHV, TEM, VEB, BEL, GES e CTX-M. Os elementos genéticos que carregam os genes ESBL são variáveis: *bla*TEM faz parte da estrutura de transpósons (Tn1,

Tn2 e Tn3), *blaSHV* faz parte da estrutura de transpósons relacionadas à IS26, *blaPER-1* faz parte de um transpóson composto peculiar, Tn1213, composto por dois elementos diferentes da sequência de inserção pertencentes à família IS4 e os genes *blaVEB* e *blaGES* estão na forma de cassetes gênicos incorporados em *integrons* de classe 1 (POIREL *et al.*, 2005; LAUDY *et al.*, 2017; AMOUDIZAJ *et al.*, 2019; ROCHA *et al.*, 2019; TAKANO *et al.*, 2019).

As β -lactamases AmpC se encaixam entre as cefalosporinas da classe C e são uma das causas de resistência a antimicrobianos β -lactâmicos, como cefalosporinas de espectro estendido, cefamicinas, monobactâmicos e carbapenêmicos. A resistência de *P. aeruginosa* as cefalosporinas é parcialmente mediada por um grupo de genes pertencentes ao sistema *amp*, que, geralmente, estão presentes nos cromossomos bacterianos, embora alguns sejam mediados por plasmídeos. Os genes *amp* foram descobertos em *Enterobacter cloacae* e, posteriormente, detectados em outras enterobactérias. Os produtos dos genes *amp* incluem a β -lactamase AmpC, a permease AmpG, a amidase citoplasmática AmpD e o regulador transcricional AmpR. A expressão de AmpC pode ser regulada por diversos genes, aumentando ou diminuindo sua expressão, e pode ter sua produção induzida por alguns β -lactâmicos e inibidores de β -lactamases. (JACOBY *et al.*, 2009; BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2012; SINGH *et al.*, 2013; MIRSALEHIAN *et al.*, 2014; BERRAZEG *et al.*, 2015; CHIKA *et al.*, 2016; AMOUDIZAJ *et al.*, 2019).

A combinação de enzimas que conferem resistência a carbapenêmicos também pode levar à emergência de amostras resistentes às fluoroquinolonas, uma vez que os marcadores de resistência podem ser transportados pelo mesmo plasmídeo (OLIVER *et al.*, 2015). Com relação às quinolonas, existem quatro mecanismos conhecidos para resistência que funcionam separadamente ou em combinação, resultando em vários graus de resistência, variando de suscetibilidade reduzida a resistência clinicamente relevante. Esses mecanismos podem ser mediados por cromossomos, por meio de mutação que levam a alterações nas enzimas alvo (DNA girase e/ou DNA topoisomerase IV), alteração na permeabilidade da membrana e efluxo ativo. Ainda, podem ser codificados por genes plasmidiais, como se observa, por exemplo, para a resistência à quinolona (*qnr*), envolvendo alteração do alvo, modificação do fármaco pela aminoglicosídeo acetiltransferase [*aac(6')-Ib-cr*] que é capaz de reduzir a atividade da ciprofloxacina (CHEN *et al.*, 2012; EL-BADAWY *et al.*, 2019). Proteínas de membrana externa também são de particular interesse em *P. aeruginosa*, devido ao seu

envolvimento no transporte de antimicrobianos, na exportação de fatores de patogenicidade e na ancoragem de estruturas que medeiam a adesão e a motilidade (STOVER *et al.*, 2000).

Os aminoglicosídeos eram considerados uma classe altamente eficiente de antimicrobianos, mas, nos últimos anos, vêm perdendo sua eficácia, observando-se aumento das taxas de resistência a eles. Com relação a *P. aeruginosa*, tem-se destacado a crescente resistência, principalmente, a gentamicina, amicacina e tobramicina em diversas localidades do mundo (ALSHAMMARI *et al.*, 2019). A resistência aos aminoglicosídeos pode ocorrer por meio dos seguintes mecanismos: produção de enzima modificadora de aminoglicosídeos (AMEs), permeabilidade celular reduzida e alteração do sítio de ligação. Dentre esses mecanismos, o mais comum é a produção de AMEs, que são codificadas por genes localizados em plasmídeos ou transpósons. As AMEs são classificadas em quatro grupos, de acordo com o tipo de modificação que elas causam nos aminoglicosídeos: fosforilação por fosfotransferases aminoglicosídicas (APHS), acetilação pelas acetiltransferases aminoglicosídicas (AACs), adenilação pelas nucleotidiltransferases aminoglicosídicas (ANTs) e adenilação pelas adeniltransferases aminoglicosídicas (AADs). Em *P. aeruginosa*, as principais AMEs envolvidas no fenômeno da resistência são codificadas pelos genes *aac(3')-I* e *ant(3')* (gentamicina), *aadA1* (estreptomicina e gentamicina), *aac(6')-Ib* (amicacina) e *aph(3')-Iib* (kanamicina) (KASHFI *et al.*, 2017; JASSIM e ALI, 2018; ALSHAMMARI *et al.*, 2019).

Outro antimicrobiano utilizado contra infecções por *P. aeruginosa* é a fosfomicina, descoberta em 1969, derivada de ácido fosfórico, isolado de culturas de *Streptomyces* spp. A atividade antibacteriana da fosfomicina envolve a interferência com a reação inicial de biossíntese do peptidoglicano. A resistência à fosfomicina se desenvolve por meio da aquisição de genes (*fos*), codificados por plasmídeo, que inativam o antimicrobiano, ou é causada pela inativação da proteína de transporte da fosfomicina GlpT (PA5235). O gene *fosA* é encontrado, principalmente, em *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* e *Acinetobacter*. Por conta do número crescente de bastonetes Gram-negativos MDR, estudos tem sido realizados a fim de resgatar o uso de antimicrobianos mais antigos, que não tem sido tão utilizados atualmente, e pesquisas demonstraram que a fosfomicina é um fármaco promissor, particularmente, em combinação com outros antimicrobianos, para infecções do trato urinário e outras infecções sistêmicas causadas por microrganismos multirresistentes (GROOTE *et al.*, 2011; LEITE *et al.*, 2016; FALAGAS *et al.*, 2019).

O aumento das taxas de detecção de amostras de *P. aeruginosa* resistentes a múltiplos fármacos antimicrobianos representa um desafio para a abordagem de pacientes com infecção associada a estes organismos, complicando muito o estabelecimento de um esquema terapêutico adequado. A colistina ainda é eficaz, na maioria dos casos, embora haja preocupação com relação à sua nefrotoxicidade e neurotoxicidade. Entretanto, as taxas de resistência crescentes a outras classes de antimicrobianos levou a uma reavaliação da segurança de sua utilização (O'DRISCOLL *et al.*, 2018).

1.2.2.4 *Stenotrophomonas maltophilia*

S. maltophilia foi isolada pela primeira vez de um derrame pleural em 1943 e, inicialmente, foi denominada de *Bacterium bookeri*. Esse microrganismo foi reclassificado como membro do gênero *Pseudomonas* em 1961, como *Xanthomonas* em 1983 e, então, como *Stenotrophomonas* em 1993 (CHANG *et al.*, 2015).

S. maltophilia é uma bactéria ubíqua, encontrada em uma variedade de ambientes, como solo, água, rizosfera e, também, em ambientes extremos, embora na natureza esteja, principalmente, associada a plantas. O organismo cumpre importantes funções nos ciclos do enxofre e nitrogênio, na degradação de compostos e poluentes complexos e na promoção do crescimento e da saúde de plantas (BROOKE *et al.*, 2017; AN; BERG, 2018). A diversidade genética e metabólica de *S. maltophilia* reflete seus diversos habitats, sendo este microrganismo responsável pela produção de diversos compostos bioativos, incluindo agentes de biocontrole de fungos, bactérias e insetos e enzimas e nanopartículas usadas em aplicações medicinais, industriais e de biorremediação de metais (SÁNCHEZ, 2015; BROOKE *et al.*, 2017).

1.2.2.4.1 Epidemiologia

S. maltophilia está associada a várias síndromes clínicas, como bacteremia, meningite, endocardite, infecções dos tratos urinário e respiratório, incluindo pneumonia em pacientes com fibrose cística e imunocomprometidos (SÁNCHEZ, 2015). A bactéria também pode ser recuperada de infecções polimicrobianas, principalmente do trato respiratório de pacientes com fibrose cística (AN; BERG, 2018). Os fatores de risco

associados à aquisição por infecções por *S. maltophilia* são transplantado de órgãos, infecção pelo vírus da imunodeficiência humana, fibrose cística, hospitalização prolongada, internação em UTI, ventilação mecânica, uso de catéteres residentes (vascular, urinário, biliar), terapia com corticosteroides ou imunossupressores e tratamento recente com antimicrobianos (CHANG *et al.*, 2015).

1.2.2.4.2 Patogenicidade

Brooke e colaboradores (2017) afirmaram que a patogenicidade de *S. maltophilia* é controlada pela disponibilidade de ferro, provavelmente, utilizando o sistema Fur. Assim, a formação de biofilme, a resposta ao estresse oxidativo, a expressão de proteínas da membrana externa e a produção de fator de sinal difusível são mediadas pela disponibilidade de ferro. Além disso, alguns fatores de patogenicidade foram descritos, incluindo o óperon Smf1-fimbrial, proteases, hemolisinas, exopolissacarídeos, lipopolissacarídeos, flagelos, lipases e uma ilha de patogenicidade que codifica proteínas do RTX (família de repetições em toxinas) e componentes do sistema de secreção transmembranar (BROOKE, 2012; SANCHEZ, 2015; CRUZ-CÓRDOVA *et al.* 2020).

Embora seja uma bactéria de baixa virulência, emergiu como um patógeno oportunista importante na medicina humana. Normalmente, não infecta hospedeiros saudáveis, mas está associado a alta morbimortalidade em indivíduos gravemente imunocomprometidos e debilitados (BROOKE *et al.*, 2017; AN; BERG, 2018). Recentemente, a Organização Mundial da Saúde classificou *S. maltophilia* como um dos principais organismos multirresistentes em ambientes hospitalares. A bactéria é capaz de sobreviver em praticamente qualquer superfície úmida, tendo sido isolada de uma ampla variedade de fontes aquáticas, como tubos de sucção, nebulizadores, endoscópios, amostras de dialisados, torneiras, drenos de pia e chuveiros (CHANG *et al.*, 2015). A incidência de IRAS associada a *S. maltophilia* está aumentando cada vez mais e ocupa o terceiro lugar entre os bastonetes Gram-negativos não fermentadores multirresistentes, atrás apenas de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* (EBRAHIM-SARAIE *et al.*, 2019).

O tratamento de pacientes com infecções causadas por *S. maltophilia* é bastante difícil, em decorrência de sua resistência intrínseca a β -lactâmicos, quinolonas, aminoglicosídeos, tetraciclina desinfetantes e metais pesados (KARAMANLIOĞLU e

DÍZBAY, 2019). Sendo assim, trimetoprim-sulfametoxazol, levofloxacina e ceftazidima são os antimicrobianos mais comumente escolhidos para o tratamento de pacientes infectados por este microrganismo (FURLAN *et al.*, 2019). No genoma de *S. maltophilia*, genes que codificam enzimas inativadoras de antimicrobianos, bombas de efluxo de múltiplos fármacos e baixa permeabilidade da membrana contribuem para sua reduzida suscetibilidade a antimicrobianos (SÁNCHEZ, 2015; BROOKE *et al.*, 2017).

1.2.2.4.3 Suscetibilidade de *S. maltophilia* a antimicrobianos

No que se refere à resistência a aminoglicosídeos, *aph(3')*-IIc e *aac(6')*-Ib, capazes de codificar duas enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, conferindo baixa suscetibilidade a esta classe de antimicrobianos (com exceção da gentamicina) já foram detectados em *S. maltophilia*. Além disso, a superprodução das enzimas di-hidropteroato sintase e a di-hidrofolato redutase, codificadas pelos genes *sul-1* e *sul-2*, são os principais mecanismos associados a resistência ao trimetoprim-sulfametoxazol, em que o gene *sul-1* está predominantemente ligado a *integrons* de classe 1, enquanto *sul-2* é encontrado, principalmente, em plasmídeos. Com isso, o trimetoprim-sulfametoxazol, que, atualmente, é o principal antimicrobiano de escolha contra infecções causadas por *S. maltophilia*, vem se apresentando menos eficaz para controle da bactéria (SÁNCHEZ, 2015; BROOKE *et al.*, 2017; EBRAHIM- SARAIE *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2019; CRUZ-CÓRDOVA *et al.*, 2020).

A resistência às quinolonas está relacionada com mutações nos alvos desse antimicrobiano (DNA girase ou topoisomerase IV) ou que levem a uma diminuição da permeabilidade e/ou superprodução de bombas de efluxo (Sánchez *et al.*, 2008). O gene *qnr* é observado no cromossomo de *S. maltophilia*, designado como *smqnr*, compreendendo as famílias QnrA, B e S. Codifica uma proteína que contribui para a resistência intrínseca às quinolonas, que protege tanto a DNA girase como a topoisomerase IV da atividade desse antimicrobiano. O gene pode ser transmitido por plasmídeo e resultar em alta resistência às quinolonas em bactérias selvagens e mutantes (SÁNCHEZ *et al.*, 2008; MALEKAN *et al.*, 2019). Além desse, os genes *oqxA*, *oqxB* e *qepA* também são responsáveis pela resistência às quinolonas, relacionados à codificação de bombas de efluxo (SÁNCHEZ *et al.*, 2008; EL-BADAWY *et al.*, 2019).

2. JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento de resistência a fármacos antimicrobianos entre bactérias é uma questão desafiadora, que impõe a necessidade de busca por protocolos alternativos para a abordagem terapêutica de pacientes com doenças infecciosas associadas a estes microrganismos. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, estima-se que, até o ano de 2050, infecções causadas por microrganismos resistentes a antimicrobianos poderão levar a mais mortes do que qualquer outra causa. Por isso, é importante entender os mecanismos associados a esta resistência e que favorecem sua disseminação, por exemplo, fatores que exercem pressão seletiva em *habitats* diversos, principalmente hospitalar. Nos últimos anos, tem-se observado interesse crescente pelo tema e muitos estudos vêm utilizando diversas técnicas para amostrar os genes relacionados a resistência a antimicrobianos em ambientes tais como, solo, água e microbiota intestinal. Destaca-se, em especial, ambientes como hospitais e outros serviços de assistência à saúde, assim como ecossistemas impactados por eles, nos quais a presença de patógenos é maior, assim como a pressão exercida por antimicrobianos. Desta forma, este estudo visa a avaliar o perfil fenotípico e genotípico de resistência a fármacos antimicrobianos de bastonetes Gram- negativos de relevância clínica isolados de pacientes hospitalizados, gerando dados que possam contribuir para o controle mais efetivo da disseminação da resistência aos antimicrobianos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil fenotípico e genotípico de resistência a fármacos antimicrobianos de bastonetes Gram-negativos não fermentadores isoladas de pacientes hospitalizados.

3.2 Objetivos específicos

- Confirmar a identificação das amostras bacterianas de interesse por métodos bioquímico-fisiológicos.
- Investigar o perfil de suscetibilidade a fármacos antimicrobianos de amostras de *A. baumannii*, *P. aeruginosa* e *S. maltophilia* por método fenotípico.
- Avaliar a presença de marcadores genéticos de resistência a antimicrobianos nas amostras bacterianas em estudo.
- Investigar a correlação entre a presença de determinantes genéticos e expressão de resistência a antimicrobianos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte (Número do Parecer 3.209.929) e da Universidade Federal de Minas Gerais (Número do Parecer 3.586.852).

4.1 Amostras bacterianas

Este estudo incluiu amostras de BGNNFs isoladas de hemocultura, urocultura e secreções de pacientes com quadros clínicos distintos, internados em um hospital de alta complexidade em Belo Horizonte, no período de novembro a dezembro de 2019, durante procedimento diagnóstico. A seleção das amostras bacterianas a serem incluídas na investigação baseou-se em análise prévia de dados do Hospital, para determinação das espécies recuperadas mais frequentemente. Entre os grupos mais prevalentes na Instituição, incluem-se três espécies de BGNNFs, que são objeto deste estudo, quais sejam, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* e *S. maltophilia*.

4.2 Confirmação da identificação das amostras bacterianas

As amostras de interesse já identificadas no Laboratório de Microbiologia do Hospital foram inoculadas em *Tryptic Soy Agar* (TSA; Difco, Sparks, MD, EUA) e encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios (ICB/UFMG), para incubação por 24h, a 37°C. A seguir, foi realizada coloração diferencial pelo método de Gram para confirmação de cultura pura e, então, as amostras foram armazenadas em *Brucella Broth* (BBL, Sparks, MD, EUA) acrescido de 10% de glicerol, em *freezer* -80°C.

Apesar da identificação prévia das amostras, realizada como procedimento diagnóstico pelo Laboratório de Microbiologia do Hospital, algumas delas apresentavam apenas identificação presuntiva. Assim, sempre que necessário, as amostras foram submetidas a testes bioquímicos-fisiológicos indicados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2004), conforme descrição a seguir.

Após cultivo em TSA e confirmação de cultura pura, as amostras indicativas de *P. aeruginosa* foram cultivadas em *Cetrimide Agar* (Difco) e submetidas às provas de oxidase e multiplicação a 42°C (em TSA). As amostras de bastonetes Gram-negativos sugestivas de *A.*

baumannii ou *S. maltophilia* foram cultivadas em *MacConkey Agar* (Difco) e avaliadas quanto à capacidade de fermentação da glicose. A seguir, as amostras não fermentadoras foram submetidas às provas de oxidase e multiplicação a 42°C. Caso os resultados fossem compatíveis com a identificação presuntiva, os testes para avaliação de motilidade e produção de DNase foram realizados.

4.3 Determinação do perfil de suscetibilidade a fármacos antimicrobianos

A avaliação do perfil de suscetibilidade a antimicrobianos das amostras em estudo foi realizada pelo método de difusão em ágar, segundo especificações do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2021). As amostras de *A. baumannii*, *P. aeruginosa* e *S. maltophilia* criopreservadas foram cultivadas em TSA, a 37°C, por 24h e, após este período, o inóculo de cada bactéria foi preparado, de acordo com o padrão 0,5 da escala de McFarland, em 3mL de solução salina estéril. A seguir, as suspensões bacterianas foram semeadas em *Mueller Hinton Agar* (MHA, Difco) com auxílio de um *swab* estéril. Decorridos cerca de 5min, discos comerciais (CECON, São Paulo, SP, Brasil) impregnados com antimicrobianos foram depositados na superfície do meio de cultura, mantendo-se distância mínima de 24mm entre o centro dos discos. O material foi incubado a 37°C e a leitura foi realizada após 16-18h de incubação para *P. aeruginosa* e 20-24h de incubação para *A. baumannii* e *S. maltophilia*. O diâmetro dos halos de inibição das amostras bacterianas foi medido com o auxílio de paquímetro digital e os valores foram comparados com tabela padrão (CLSI, 2021). O painel de fármacos antimicrobianos testados frente a cada microrganismo está listado no Quadro 1.

Quadro 1: Painel de antimicrobianos testados para cada espécie bacteriana

<i>Acinetobacter</i> <i>baumannii</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	<i>Stenotrophomonas</i> <i>maltophilia</i>
Ampicilina-sulbactam	Piperacilina-tazobactam	Levofloxacina
Piperacilina-tazobactam	Ceftazidima Cefepime	Sulfametoxazol- trimetropim
Ceftazidima	Aztreonam Imipenem	
Cefepime	Meropenem	
Cefotaxima	Gentamicina	
Ceftriaxona	Tobramicina	
Imipenem	Amicacina	
Meropenem	Ciprofloxacina	
Gentamicina	Levofloxacina	
Tobramicina		
Amicacina		
Doxiciclina		
Tetraciclina		
Ciprofloxacina		
Levofloxacina		
Sulfametoxazol- trimetropim		

Fonte: Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI, 2021).

4.4 Pesquisademarkadoresgenéticosderesistênciia fármacos antimicrobianos

4.4.1 Extração de DNA

O DNA das amostras bacterianas foi extraído pelo método de fervura, como descrito por OLSVIK e STROCKBINE, 1993, com algumas alterações. Cada bactéria foi cultivada em TSA, a 37°C, por 24h e, após isso, com o auxílio de uma alça bacteriológica estéril, parte das culturas foram transferidas para 400µL de água Milli-Q[®] estéril. O material foi submetido a fervura por 12min e, após resfriamento, centrifugado por 12min a 17.562G a 4°C. O sobrenadante foi, então, transferido para outro tubo e estocado a -20°C. A concentração de DNA foi estimada em espectrofotômetro (Nanodrop ND-1000; Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA), empregando-se comprimento de onda de 260nm e, para cálculo da relação DNA/proteína, a leitura foi realizada também a 280nm. As amostras de DNA foram diluídas em água Milli-Q[®] estéril até concentração de 20ng/mL e o material foi novamente armazenado em freezer a -20°C, até o momento de sua utilização.

4.4.2 Reação de polimerização em cadeia

A pesquisa da presença de genes que codificam resistência a fármacos antimicrobianos foi realizada por reação de polimerização em cadeia (PCR). Foram investigados marcadores de resistência a antimicrobianos indicados para cada uma das bactérias alvo do estudo (Quadro 2), compreendendo β-lactâmicos (inclusive, carbapenêmicos), quinolonas, sulfonamidas, polimixina e aminoglicosídeos. O *mix* era constituído por tampão 1X (Ludwig Biotecnologia[®]), MgCl₂ 1,5 mM (Phoneutria[®]), dNTPs 0,8mM (Ludwig Biotecnologia, Alvorada, RS, Brasil), primers *forward* e *reverse* 0,5pm/µL, Taq polimerase 1,0U (Phoneutria, Belo Horizonte, MG, Brasil), água milli-Q[®] e DNA 2,0ng/ µL. Foram empregados primers e protocolos previamente descritos (Anexo).

Quadro 2: Painel de genes de resistência testados para cada uma das espécies bacterianas

Classes de antimicrobianos	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Carbapenemases	<i>blaKPC-2</i> , <i>blaNDM-1</i> , <i>blaIMP</i> , <i>blaVIM</i> , <i>blaSIM</i> , <i>blaOXA-23</i> , <i>blaOXA-48</i> , <i>blaOXA-58</i> , <i>blaOXA-143</i>	<i>blaKPC-2</i> , <i>blaNDM-1</i> , <i>blaIMP</i> , <i>blaVIM</i> , <i>blaSPM</i> , <i>blaGIM</i>	-
ESBLs	-	<i>blaSHV</i> , <i>blaTEM</i> , <i>blaCTX-M</i> , <i>blaBEL-1</i> , <i>blaGES</i>	-
Quinolonas	-	-	<i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> , <i>qnrS</i> , <i>qepA</i> , <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i>
Sulfonamidas	-	-	<i>sul-1</i> , <i>sul-2</i> , <i>sul-3</i>
Polimixinas	<i>mcr-1</i>	-	-
Aminoglicosídeos	-	<i>aac (6')-Ib-cr</i> ,	-

Após amplificação, um volume de 5µL dos produtos de PCR foi acrescido de 1µL de tampão de amostra para DNA (*loading buffer* 6x; azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol FF 0,25%, glicerol 30%) e submetido a eletroforese em gel de agarose a 1%. Sempre que disponível, foram empregados controles positivo (Quadro 3) e negativo (água Milli-Q®). Não havia controle positivo disponível para os seguintes marcadores: *blaOXA-143*, *blaBEL-1*, *oqxB*, *oqxA*, *sul-1* e *sul-2*. Como padrão de massa molecular, foi utilizado o marcador de 100 pb (Ludwig Biotecnologia). Os géis foram submetidos à coloração por cerca de 30min em TBE 1x (Tris Base, Ácido Bórico, EDTA.2H₂O) acrescido de GelRed 10.000X

(Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). Os géis foram examinados em equipamento Gel Doc Ez System (BioRad, Santo Amaro, SP, Brasil) e o resultado foi fotodocumentado.

Quadro 3: Controles positivos empregados para cada marcador genético

Gene	Controle positivo	Origem
<i>bla</i> CTX-M	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Laboratório Especial de Microbiologia Clínica (LEMC) e Laboratório Alerta, Escola Paulista de Medicina, UNIFESP
<i>bla</i> SHV	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
<i>bla</i> TEM	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
<i>bla</i> KPC-2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
<i>bla</i> IMP	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
<i>bla</i> GIM	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
<i>bla</i> VIM	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
<i>mcr</i> -1	<i>Escherichia coli</i>	
<i>bla</i> oxa-48	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
<i>bla</i> SIM	<i>Acinetobacter</i> sp.	
<i>bla</i> NDM-1	<i>Acinetobacter baumannii</i>	
<i>bla</i> GES	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
<i>bla</i> oxa-23	<i>Acinetobacter baumannii</i>	
<i>qnr</i> B	<i>Escherichia coli</i>	Amostras cedidas pela professora Magna Cristina de Paiva. Laboratório Microscopia/ Diagnóstico Laboratorial e Microbiologia Clínica da Universidade Federal São João Del Rei, Campos Centro- oeste, Divinópolis (MG)
<i>qnr</i> S	<i>Escherichia coli</i>	
<i>aac</i> (6')-Ib-cr	<i>Escherichia coli</i>	

4.5 Análise estatística

Os dados do antibiograma foram analisados pelo *software* estatístico PAST (Palaeontological Statistics) que possui funções para manipulação de dados, plotagem, estatística univariada e multivariada, entre outros atributos. A análise de dados multivariados usada foi a PCoA (Análise de Coordenadas principais) que encontra os autovalores e autovetores de uma matriz contendo as distâncias entre todos os pontos de dados, medidos com a distância de Gower ou distância Euclidiana. Esse parâmetro aceita todos os tipos de dados, tanto quantitativos, como qualitativos e binários (HAMMER *et al.*, 2001).

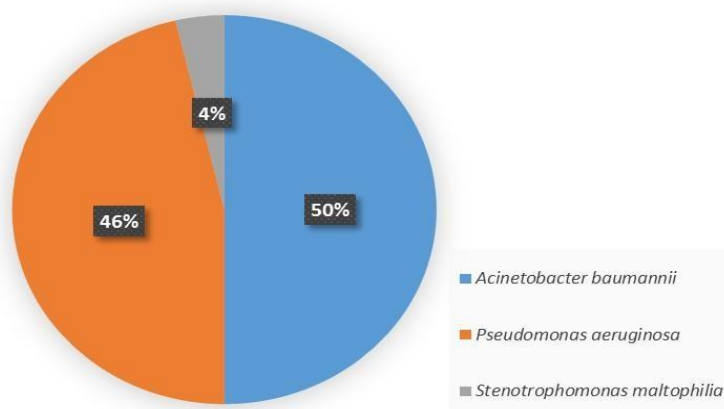
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O controle de bactérias multirresistentes a fármacos antimicrobianos, frequentemente associadas à etiopatogenia das infecções relacionadas à assistência à saúde, tem se tornado, cada vez mais, um sério problema de saúde em nível mundial, uma vez que a globalização facilita a disseminação desses microrganismos para todas as partes do mundo (PEREZ *et al.*, 2007; BOJKOVIC *et al.*, 2015). Ainda, a pressão seletiva exercida pelo uso de antimicrobianos, ferramenta fundamental para a abordagem de pacientes acometidos por doenças infecciosas, desafia ainda mais a proposição de medidas eficazes para evitar o aumento das taxas de resistência aos mesmos. Considerando a importância do tema, esse estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o perfil de resistência a antimicrobianos de BGNNFs isolados de pacientes internados em um hospital de alta complexidade de Belo Horizonte.

5.1 Perfil das amostras bacterianas estudadas

Foram incluídas no estudo 108 amostras clínicas de BGNNFs, sendo 54 (50%) de *A. baumannii*, 50 (46,3%) de *P. aeruginosa* e 4 (3,7%) de *S. maltophilia* (Gráfico 1).

Gráfico 1: Perfil de distribuição das 108 amostras clínicas de BGNNFs estudadas



5.2 Antibiograma

A figura 3 ilustra o antibiograma realizado para as amostras. O perfil de suscetibilidade para *A. baumannii* é demonstrado pelo gráfico 2.

Figura 3: Ilustração do antibiograma realizado por disco-difusão

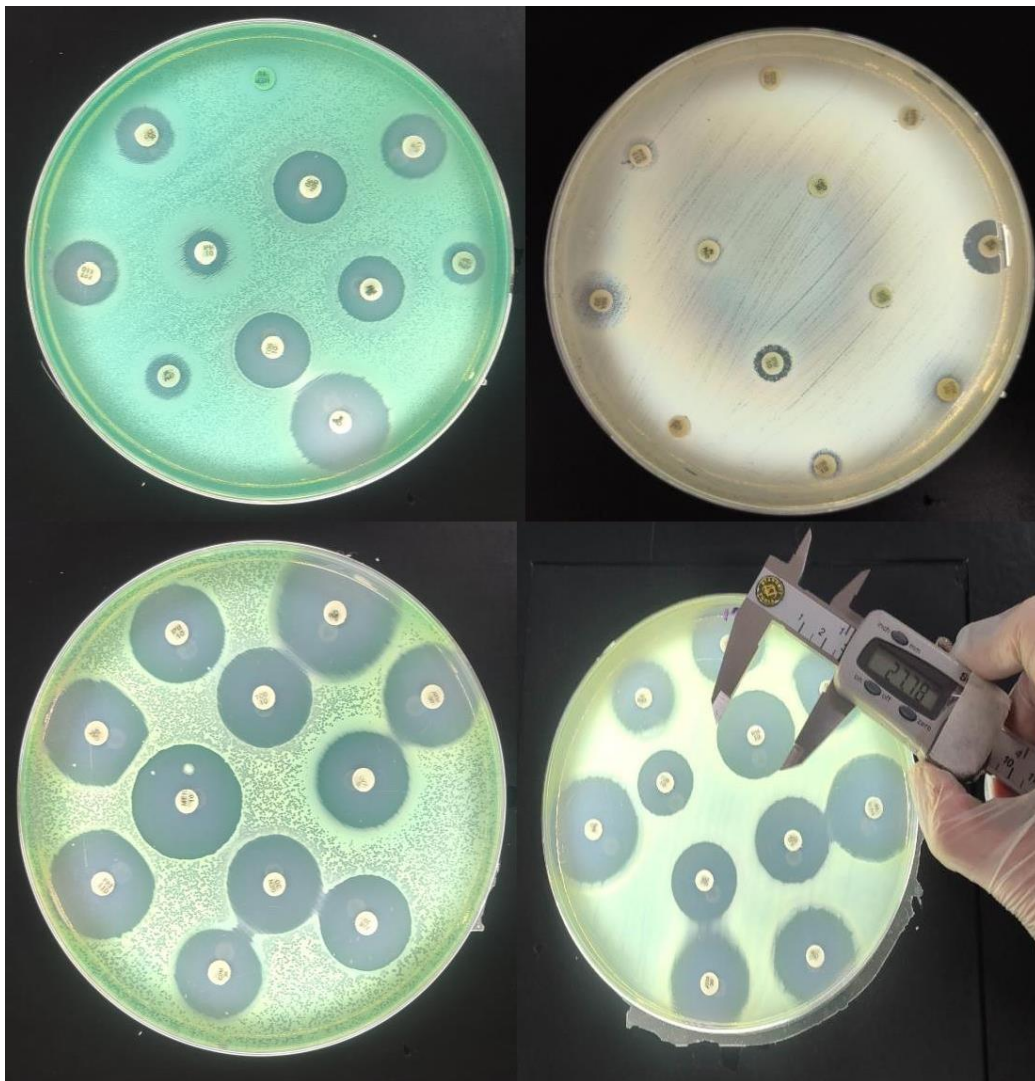
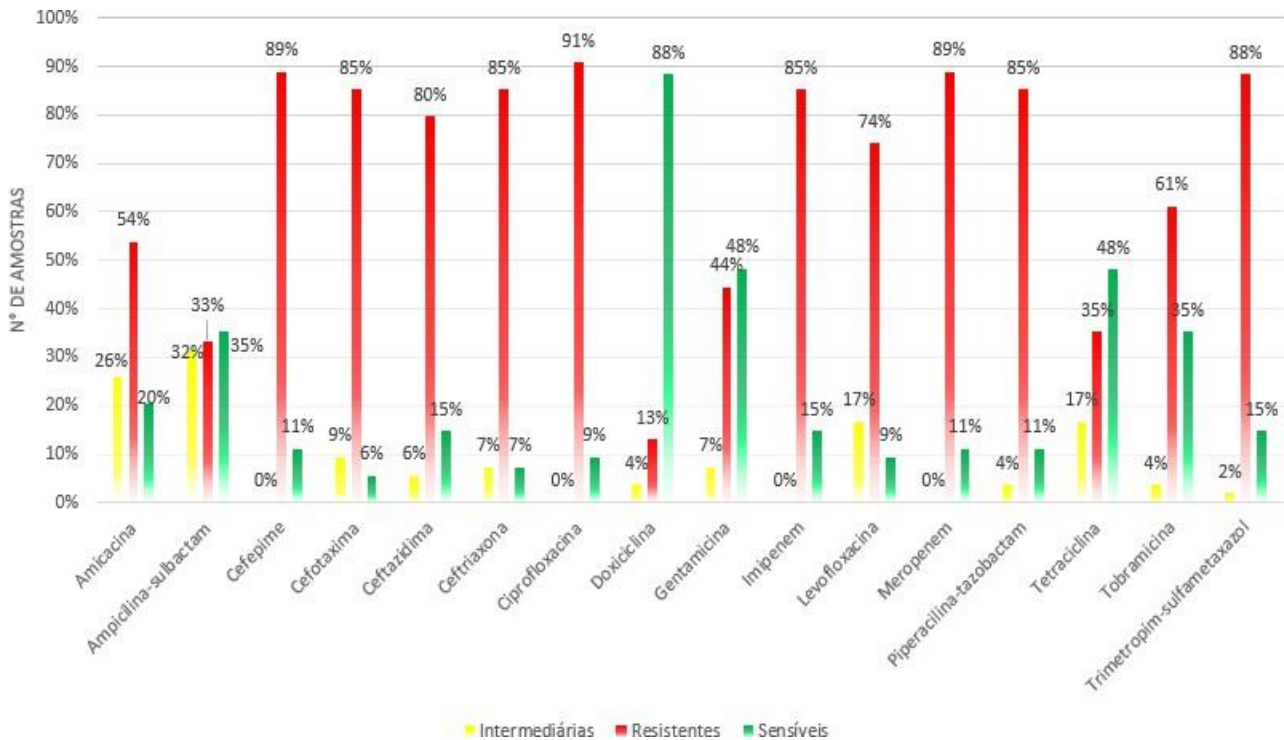


Gráfico 2: Perfil de resistência a antimicrobianos das 54 amostras de *Acinetobacter baumannii*



Os resultados obtidos são preocupantes, demonstrando percentuais elevados de resistência à maioria dos antimicrobianos testados, utilizados rotineiramente na clínica. Para 12 dentre os 16 fármacos avaliados, as taxas de resistência foram superiores a 50%. Destacam-se, em especial, ciprofloxacina, meropenem, cefepime, imipenem, piperacilina-tazobactam, ceftriaxona, cefotaxima, trimetropim-sulfametoxazol, ceftazidima e levofloxacina, para as quais os percentuais de resistência variaram entre 75 e 90%, aproximadamente.

A análise do perfil de resistência por amostra revelou que 89% das amostras estudadas é multidroga resistente (MDR), uma vez que apresentavam resistência a um ou mais antimicrobianos de pelo menos três classes de distintas, dentre β -lactâmicos, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e tetraciclina. Esses números são mais críticos do que observados em outros estudos realizados por Li- Kuang e colaboradores (2017), Filho e Fiuza (2020) e Souza e colaboradores (2021).

Dentre as classes de antimicrobianos mais utilizados atualmente para tratar pacientes com infecções causadas por *A. baumannii*, os β -lactâmicos ganham destaque, entre outras razões, devido ao seu espectro de ação, suas indicações clínicas e características farmacocinéticas que os permitem penetrar a barreira placentária e hematoencefálica. Mas, o uso indiscriminado desses antimicrobianos, desde sua descoberta, vem diminuindo drasticamente sua eficácia (ARRUDA *et al.*, 2019). Isto pode ser comprovado por meio dos resultados apresentados acima, que mostram taxas de resistência superiores a 80% para todos os β -lactâmicos testados (imipenem, meropenem, piperacilina-tazobactam, cefepime, ceftazidima, ceftriaxona, cefotaxima), com exceção da ampicilina-sulbactam. Ainda que em percentual bastante inferior, 33% das amostras de *A. baumannii* expressaram resistência à ampicilina-sulbactam, que combina a atividade do fármaco β -lactâmico ampicilina com a ação do sulbactam, um inibidor competitivo irreversível de β -lactamases, resultando em um efeito sinérgico, que o tornou mais eficaz no combate a linhagens bacterianas resistentes (TEMOCIN *et al.*, 2015).

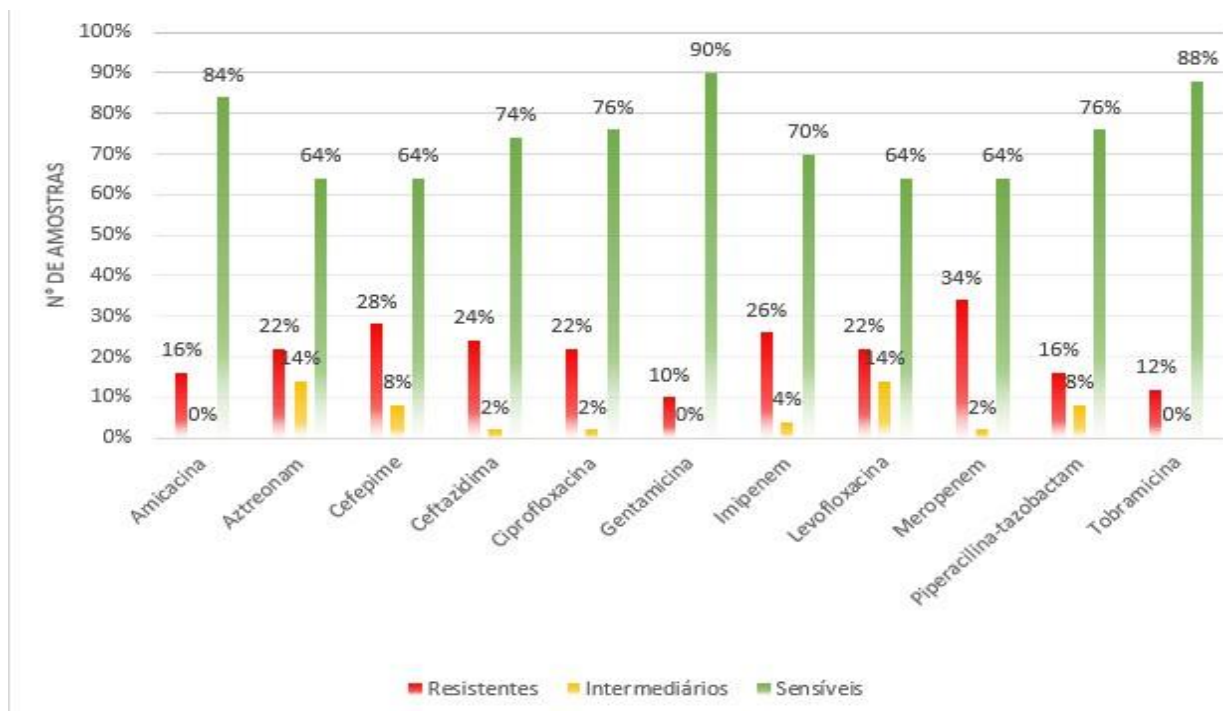
Com relação as fluoroquinolonas testadas (ciprofloxacina e levofloxacina), a taxa de resistência foi de 89%. Segundo Vásquez-López (2020), o mecanismo de resistência de *A. baumannii* às fluoroquinolonas consiste em mutações em *gyrA* e *parC*, regiões determinantes de resistência a quinolonas (QRDRs) da DNA girase e topoisomerase IV, que interferem na união desses antimicrobianos às suas proteínas-alvo, além da superexpressão de bombas de efluxo (ATTIA; ELBARADEI, 2020).

A resistência observada para tetraciclinas foi de 35% para tetraciclina e 13% para ambos. Destaca-se o fato de que todas as amostras que foram resistentes à doxiciclina, também foram resistentes à tetraciclina, ou seja, a doxiciclina tem se mostrado uma droga mais eficaz quando se trata de linhagens resistentes a esta classe de antimicrobianos (GORGUN *et al.*, 2020). Ao se analisar as tetraciclinas, temos um percentual de resistência bem mais baixo, fazendo com que a classe seja indicada para pacientes refratários ao tratamento com as demais classes de antimicrobianos testadas. Enfatiza-se que a doxiciclina e a minociclina, tetraciclinas de segunda geração, tem meia-vida sérica longa, alta solubilidade lipídica, baixo potencial de resistência e atividade aumentada contra certos patógenos (GIAMARELLOU, 2010; GORGUN *et al.*, 2020). A resistência contra esse grupo de fármacos está associada, principalmente, por bombas de efluxo mediadas por proteínas de resistência na membrana citoplasmática bacteriana (VÁSQUEZ-LÓPEZ *et al.*, 2020).

Para os aminoglicosídeos, a taxa de resistência observada nessas amostras foi de 80% para, pelo menos, um antimicrobiano da classe. Esse número é mais elevado do que observado por Souza e colaboradores (2021) para amostras de *A. baumannii* isoladas em hospital oncológico em Belém, PA, cujos dados mostram a taxa de resistência em torno de 60%.

Já para *P. aeruginosa* o perfil de suscetibilidade é representado pelo gráfico 3.

Gráfico 3: Perfil de resistência a antimicrobianos das 50 amostras de *Pseudomonas aeruginosa*



Para *P. aeruginosa*, praticamente todos os mecanismos de resistência a antimicrobianos que são reconhecidos na atualidade já foram descritos. Este conjunto compreende mecanismos intrínsecos e adquiridos, sendo mais difundidos e mais comuns aqueles relacionados aos principais fármacos empregados contra a bactéria, quais sejam β -lactâmicos, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos (DRISCOLL *et al.*, 2007; PEREIRA *et al.*, 2015).

A resistência a β -lactâmicos expressa por *P. aeruginosa* envolve estratégias baseadas

na diminuição da permeabilidade da parede celular, inativação dos compostos por produção de β -lactamases e em mecanismos de modificações da molécula-alvo desta classe de antimicrobianos (STRAREVA; YORDANOV, 2009). *P. aeruginosa* apresenta resistência intrínseca e, também, adquire a capacidade de síntese de β -lactamases por transferência gênica ou mutação (DRICOLL *et al.*, 2007; ROIAS, 2017).

Neste estudo, *P. aeruginosa* apresentou as seguintes taxas de resistência aos β -lactamâmicos incluídos no estudo: 34% das amostras expressaram resistência ao meropenem, 28% ao cefepime, 26% ao imipenem, 24% a ceftazidima, 22% ao aztreonam e 16% a piperacilina-tazobactam. Se comparado com as demais classes de antimicrobianos indicados para se tratar pacientes com infecções causadas por *P. aeruginosa*, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos, que serão discutidos a seguir, os β -lactamâmicos são os que apresentam maior taxa de resistência. Isto pode ser explicado pelo fato de que esta classe é a mais utilizada atualmente, o que tem implicação direta na pressão seletiva que a bactéria sofre, fazendo com que se sobressaiam as linhagens resistentes, que, então, acabam se disseminando cada vez mais (ARRUDA *et al.*, 2019).

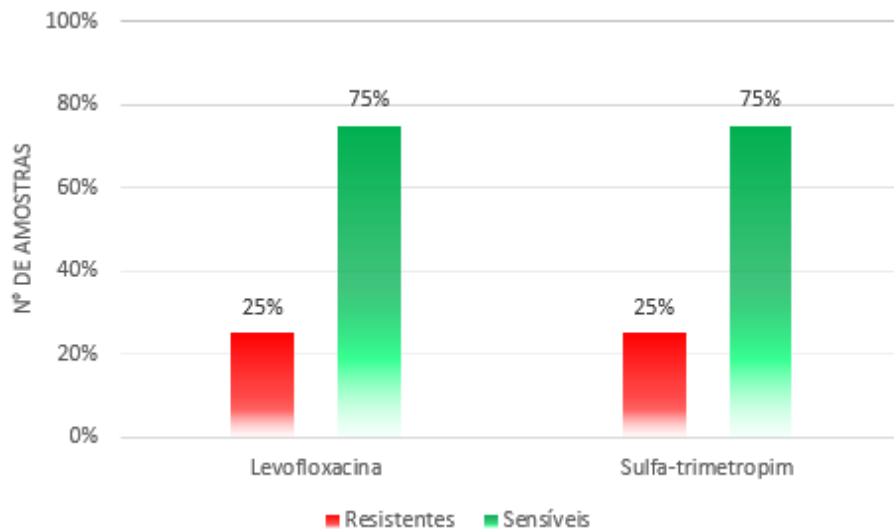
Com relação às fluoroquinolonas, a resistência em *P. aeruginosa* ocorre, principalmente, por mudanças estruturais no que diz respeito às enzimas-alvo (DNA girase e topoisomerase IV) e pela expulsão do antimicrobiano através de sistemas de efluxo ativo. É comum a resistência mediada por plasmídeos (*qnr*) (TAVARES, 2020). Os resultados gerados por esta investigação revelam que todas as 11 (22%) amostras são resistentes a ciprofloxacina e levofloxacina, concomitantemente.

P. aeruginosa apresenta vários mecanismos de resistência aos aminoglicosídeos, dentre eles, modificação enzimática através das enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (acetiltransferases, fosforiltransferases, adeniltransferases e nucleotidiotransferases), diminuição da permeabilidade da membrana externa (alteração no sistema de porinas), sistemas de efluxo ativo e modificação do alvo (subunidade 16S do rRNA) (TAVARES, 2020). Os aminoglicosídeos são a principal classe de antimicrobianos com potencial efeito bactericida para o tratamento de infecções por *Pseudomonas*. Eles são usados sozinhos ou em combinação para superar a resistência a fármacos antimicrobianos, particularmente, em pacientes com fibrose cística e endocardite infecciosa (KUMAR *et al.*, 2020). Os resultados do presente estudo vão de encontro ao que foi exposto anteriormente. As taxas de resistência a esta classe de antimicrobianos foram as menores em

comparação com as demais classes testadas, variando entre 16% para amicacina e 10% para gentamicina.

O perfil de suscetibilidade em *S. maltophilia* é demonstrado pelo gráfico 4.

Gráfico 4: Perfil de resistência a antimicrobianos das quatro amostras de *Stenotrophomonas maltophilia*



A prevalência de infecções graves causadas por *S. maltophilia* continua a aumentar concomitantemente com sua resistência a antimicrobianos. Paralelamente, as opções de tratamento viáveis, incluindo fármacos antimicrobianos com atividade confiável e perfil de segurança aceitável continua a diminuir (BIAGI *et al.*, 2020). A combinação trimetropim-sulfametoxazol tem sido amplamente utilizada, sendo considerado o fármaco de escolha no tratamento de pacientes com infecções causadas pela bactéria. As fluoroquinolonas (levofloxacina) podem ser usadas como alternativa em casos de resistência, intolerância ou efeitos adversos a trimetropim-sulfametoxazol (WU *et al.*, 2020).

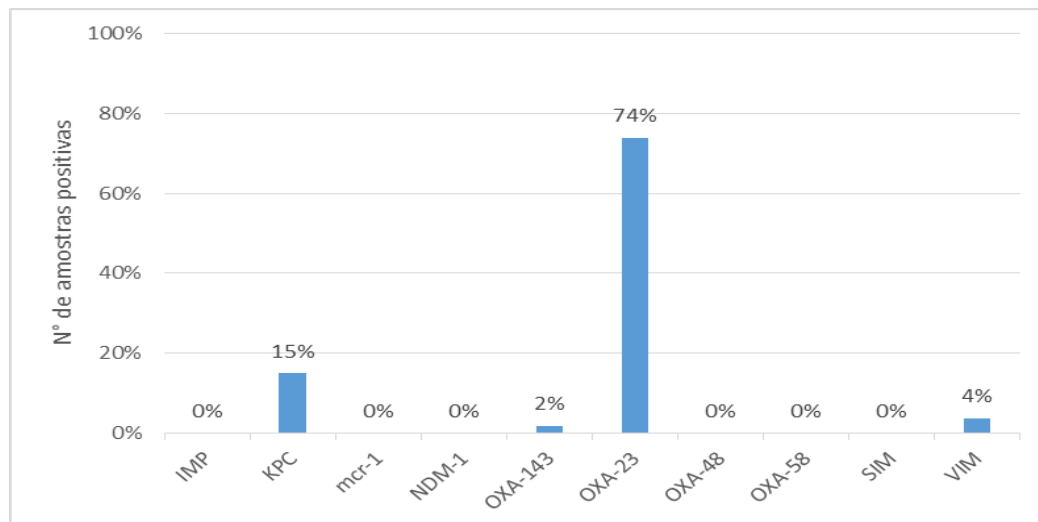
Entre as amostras de *S. maltophilia*, uma (25%) expressou resistência a ambos os antimicrobianos testados e muito frequentemente prescritos. Considerando o número reduzido de amostras de *S. maltophilia* analisadas, o dado é pouco significativo, não permitindo qualquer análise mais aprofundada.

5.3 Perfil genotípico de resistência

Em relação à detecção de marcadores genéticos de resistência a antimicrobianos, 72,2% (78/108) das amostras albergavam pelo menos um gene dentre os avaliados. O gráfico 5 ilustra o número total de amostras positivas para *A. baumannii*.

Fundamental ressaltar que, para os marcadores *bla*oxa-143, *bla*BEL-1, *oqx*B, *oqx*A, *sul*-1 e *sul*-2, não dispomos de controles positivos. Assim, embora as reações de amplificação tenham gerado bandas únicas com a massa molecular compatível, alguns dos *amplicons* serão submetidos a sequenciamento, para que o resultado possa ser confirmado. Na apresentação e discussão destes resultados, consideramos os dados como confiáveis.

Gráfico 5: Marcadores genéticos de resistência a antimicrobianos observados nas 54 amostras de *Acinetobacter baumannii*



Os carbapenêmicos têm sido usados como antimicrobianos de primeira escolha em doenças infecciosas graves associadas a *A. baumannii*. Como esperado, isto tem impactado na disseminação de amostras resistentes (RODRIGUEZ *et al.*, 2016). A resistência aos carbapenêmicos é mediada, principalmente, por quatro classes de enzimas, segundo a classificação de Ambler. As carbapenemases mais reportadas em *A. baumannii* pertencem à família das serina β -lactamases de classe D (OXAs) e à família das metalo β -lactamases de classe B (VIM, SIM, IMP, NDM) (POIREL e NORDMANN, 2006).

As metalo β -lactamases codificadas por *blaVIM*, *blaIMP*, *blaSIM* e *blaNDM* são capazes de hidrolisar todos os β -lactâmicos. Já as oxacilinasas, codificadas pelos genes *blaOXA*, são mais frequentemente detectadas em *A. baumannii* (BARLETTA *et al.*, 2018).

Assim, a superexpressão de marcadores *blaOXA* é um dos principais mecanismos que conferem resistência a carbapenêmicos entre amostras de *A. baumannii* (ADAMS-HADUCH *et al.*, 2008). Entre eles, *blaOXA-23* foi associado a uma maior disseminação da resistência a carbapenêmicos com consequências clínicas (MUGNIER *et al.*, 2009).

Com relação à resistência a carbapenêmicos, 85% das amostras de *A. baumannii* apresentaram resistência a ambos os fármacos (imipenem e meropenem) avaliados. A maior parte (76%) dessas amostras também albergava os genes *blaOXA-23* e *blaOXA-143*. Apenas 9% das amostras da bactéria resistentes a carbapenêmicos não albergavam os genes mencionados, o que sugere que a resistência deve-se a outros mecanismos, como bombas de efluxo, redução ou inativação da expressão de porinas, modificação na expressão ou síntese de novas proteínas de ligação à penicilina (RAMIREZ *et al.*, 2020). Os demais genes que codificam oxacilinasas estudados (*blaOXA-48* e *blaOXA-58*) não foram detectados. Estudos anteriores relataram que amostras de *A. baumannii* produtoras de OXA-23 emergiram e substituíram aquelas que albergavam *blaOXA-58*, anteriormente predominantes (LIAKOPOULOS *et al.*, 2012), fenômeno este que pode estar ligado à atividade hidrolítica mais forte de OXA-23 em comparação com OXA-58 (PELEG *et al.*, 2008).

Os genes *blaIMP*, *blaSIM* e *blaVIM* se encontram frequentemente localizados em *integrans* de classe 1 (OPAZO *et al.*, 2012). Dentre as amostras de *A. baumannii* incluídas no estudo, apenas 4% albergavam *blaVIM*. Os marcadores *blaIMP* e *blaSIM* não foram detectados. Os resultados desta investigação se assemelham àqueles publicados por Moulana e colaboradores (2020), que também observaram apenas *blaVIM* nas amostras de *A. baumannii* analisadas.

O gene *blaNDM-1* confere resistência a quase todos os β -lactâmicos, com exceção dos monobactâmicos. É mais comumente encontrado em plasmídeos, e, por isso, sua disseminação para outras amostras ocorre mais frequentemente (RAMIREZ *et al.*, 2020). Neste estudo, nenhuma amostra de *A. baumannii* albergava o gene.

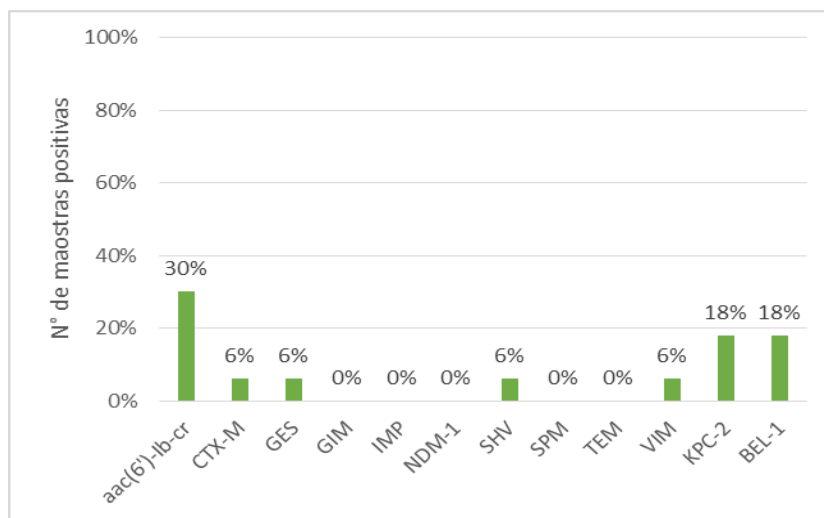
As enzimas do grupo KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) são β -lactamases que hidrolisam carbapenêmicos de classe A (YIGIT *et al.*, 2001). As bactérias que

carreiam *bla*KPC são, geralmente, multirresistentes, limitando as opções terapêuticas (MUNOZ-PRICE *et al.*, 2013). Os resultados desta investigação demonstram que cerca de 15% (8/54) das amostras de *A. baumannii* albergavam o gene.

Como a resistência vem aumentando entre as bactérias Gram-negativas, com destaque para *A. baumannii*, abordagens terapêuticas usuais têm se tornado limitadas. Diante disso, o uso da colistina, uma polimixina descoberta há mais de 50 anos, está sendo reavaliado (LI *et al.*, 2006). A resistência à polimixina foi atribuída a mutações cromossômicas. No final de 2015, um gene plasmidial que codifica resistência à polimixina, denominado *mcr-1*, foi relatado, pela primeira vez, na China (SHABBAN *et al.*, 2020). Na presente investigação, *mcr-1* não foi detectado em *A. baumannii*, o que não exclui a possibilidade de resistência à colistina, uma vez que esse fenômeno também pode estar relacionado com modificações do lipídio A do lipopolissacarídeo (LPS) (BECEIRO *et al.*, 2011).

O gráfico 6 demonstra a taxa de amostras positivas para cada um dos genes relacionados com a resistência em *P. aeruginosa*.

Gráfico 6: Marcadores genéticos de resistência a antimicrobianos observados nas 50 amostras de *Pseudomonas aeruginosa*



Relativo a *P. aeruginosa*, os resultados demonstram que 30% das amostras (15/50) albergavam o marcador *aac(6)-Ib-cr*. Entretanto, o antibiograma indicou apenas nove amostras resistentes a, pelo menos, um representante da classe dos aminoglicosídeos (gentamicina, tobramicina e amicacina) e, entre elas, seis eram positivas para o referido gene.

Isso indica que o gene não estava sendo expresso) por todas as amostras. Aquelas bactérias que apresentaram resistência a dois ou três aminoglicosídeos foram positivas para *aac(6')-Ib-cr*. A resistência a essa classe de antimicrobianos pode estar correlacionada com a presença de outros genes que codificam enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, como *ant(3'')-Ia*, *aac(6')-Ib*, *aph(3')-Ia*, *aac(3)-Ia* e *aph(3')* (VASQUÉZ-LÓPEZ *et al.*, 2019). Além disso, o gene *aac(6')-Ib-cr* também está relacionado com resistência a ciprofloxacino (CHEN *et al.*, 2012; EL-BADAWY *et al.*, 2019).

As β -lactamases de espectro estendido (ES β LS) são responsáveis por conferir resistência a penicilinas e cefalosporinas, especialmente (ALGAMMAL *et al.*, 2020). Os genes mais comumente associados com síntese de ES β LS são *bla*CTX-M, *bla*SHV e *bla*TEM, *bla*GES e *bla*BEL-1 (EJAZ, 2020; TAKANO *et al.*, 2019). Todos eles, exceto *bla*TEM, foram detectados nas amostras de *P. aeruginosa* estudadas, porém, em percentuais baixos (16% para *bla*BEL-1 e 6% para *bla*CTX-M, *bla*SHV e *bla*GES). Uma única amostra do microrganismo apresentou, concomitantemente, dois marcadores (*bla*CTX-M e *bla*SHV) e esta é, justamente, a única amostra resistente à penicilina e às cefalosporinas testadas. As demais amostras, apesar de carrear algum desses genes, não expressaram resistência a essas classes de β -lactâmicos.

Outro mecanismo importante de resistência aos carbapenêmicos é a produção de metalo- β -lactamases (M β LS), que podem hidrolisar penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos. Os genes que codificam tais enzimas são, frequentemente, localizados em *integrans* e transpósons e propagados horizontalmente entre bactérias Gram-negativas (BAZGIR *et al.*, 2020). Vários desses marcadores já foram relatados para *P. aeruginosa*, incluindo *bla*IMP (imipenemase), *bla*VIM (M β L codificada por *integron* de Verona), *bla*SPM (M β L de São Paulo), *bla*GIM (imipenemase da Alemanha), *bla*SIM (imipenemase de Seul) e *bla*NDM (M β L de Nova Deli). Os genes *bla*IMP e *bla*VIM são aqueles mais comumente adquiridos (HONG *et al.*, 2015).

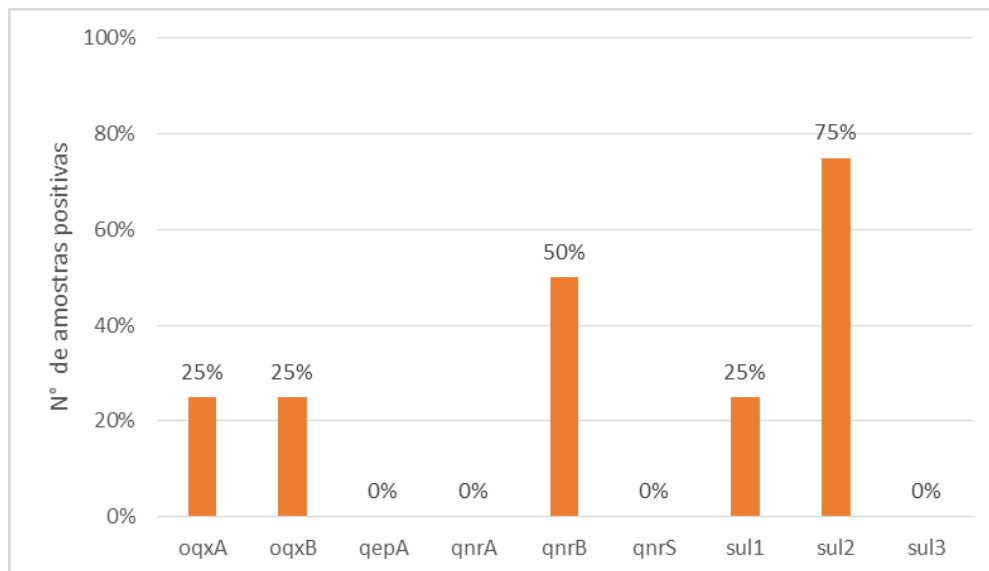
Na presente investigação, apenas *bla*VIM foi detectado [6% (3/50) das amostras de *P. aeruginosa*]. Estas amostras albergavam mais de um marcador genético, incluindo o gene que confere resistência aos aminoglicosídeos. Entretanto, apenas uma dessas amostras expressou resistência e somente aos carbapenêmicos (imipenem e meropenem). As duas outras amostras apresentaram perfil de sensibilidade, o que indica que o gene não estava sendo expresso pelas mesmas.

Como mencionado, KPC é a carbapenemase de classe A mais significativa do ponto de vista clínico (QUEENAN e BUSH, 2007; WANG *et al.*, 2016). Entre as amostras de *P. aeruginosa*, 18% (9/50) albergavam *bla*KPC-2. Neste subgrupo, quatro expressaram resistência a ambos, imipenem e meropenem, e uma apenas ao meropenem. Mais uma vez, o resultado sugere a não expressão do marcador.

Assim, os carbapenêmicos são os agentes antimicrobianos mais eficazes para o tratamento de pacientes com doenças infecciosas graves associadas a *P. aeruginosa*. Os mecanismos de resistência a este grupo de fármacos são diversos, envolvendo, além da síntese de carbapenemases, superexpressão de bombas de efluxo e repressão ou inativação de porinas, dentre outros (GAETE *et al.*, 2020; HU *et al.*, 2021).

O gráfico 7 apresenta o percentual de amostras positivas para os respectivos genes relacionados com resistência em *S. maltophilia*.

Gráfico 7: Marcadores genéticos de resistência a antimicrobianos observados nas quatro amostras de *Stenotrophomonas maltophilia*



No que se refere a *S. maltophilia*, Mendes e colaboradores (2020) afirmam que a resistência a trimetropim-sulfametoxazol tem aumentado nos últimos anos, principalmente, devido à disseminação dos genes *sul-1*, *sul-2* e *sul-3*. Os resultados da presente investigação mostram que três das quatro amostras da bactéria albergavam *sul-2*, sendo que uma delas também carregava *sul-1*. O gene *sul-3* não estava presente em nenhuma das amostras, reforçando o relato de que *sul-1* e *sul-2* são mais prevalentes na espécie (BROOKE *et al.*, 2017). Apesar da presença dos genes *sul*, as três amostras não expressaram resistência a trimetropim-sulfametoxazol, o que sugere que os genes não estão sendo expressos. Por outro lado, a única amostra que não albergava nenhum desses marcadores genéticos foi resistente ao antimicrobiano, o que demonstra a relação com outros mecanismos de resistência independentes da presença dos genes *sul*.











As fluoroquinolonas estão entre os poucos agentes antibacterianos que ainda mostram atividade importante contra *S. maltophilia*. Entretanto, a resistência a essa classe de antimicrobianos aumentou nos últimos anos (EBRAHIM-SARAIE *et al.*, 2019). Os genes *qnr* são amplamente distribuídos entre bastonetes Gram- negativos, como as enterobactérias, conferindo resistência de baixo nível às fluoroquinolonas (LI; LI, 2017). Outro mecanismo relacionado com a resistência a estes fármacos relaciona-se à expressão de bombas de efluxo codificadas por diferentes marcadores, como *oqxA*, *oqxB* e *qepA* (EL-BADAWY *et al.*, 2019). Os resultados deste trabalho indicam que uma amostra carregava *oqxA*, uma albergava *oqxB* e duas, *qnrB*. Os marcadores *qnrA*, *qnrS* e *qepA* não foram detectados. Como discutido para os genes *sul*, amostras positivas para *oqxA*, *oqxB* e *qnrB* não expressaram resistência a fluoroquinolonas, ao passo que a única amostra que não albergava nenhum desses marcadores genéticos foi, também, a única a apresentar perfil fenotípico de resistência à quinolona (levofloxacina).

5.4 Análises estatísticas

A respeito das análises estatísticas, os três gráficos apresentados a seguir, gerados pelo programa PAST para cada espécie estudada, apresentam o número correspondente de cada amostra seguido por uma sigla que representa o sítio de infecção do qual a bactéria foi isolada e cada símbolo esférico de uma determinada cor representa as diferentes datas de coletas dessas amostras (Quadro 4).

Esse tipo de análise tem como base agrupar as amostras de acordo com a proximidade de características em comum que elas contêm, logo, amostras mais próximas são consideradas mais semelhantes entre si.

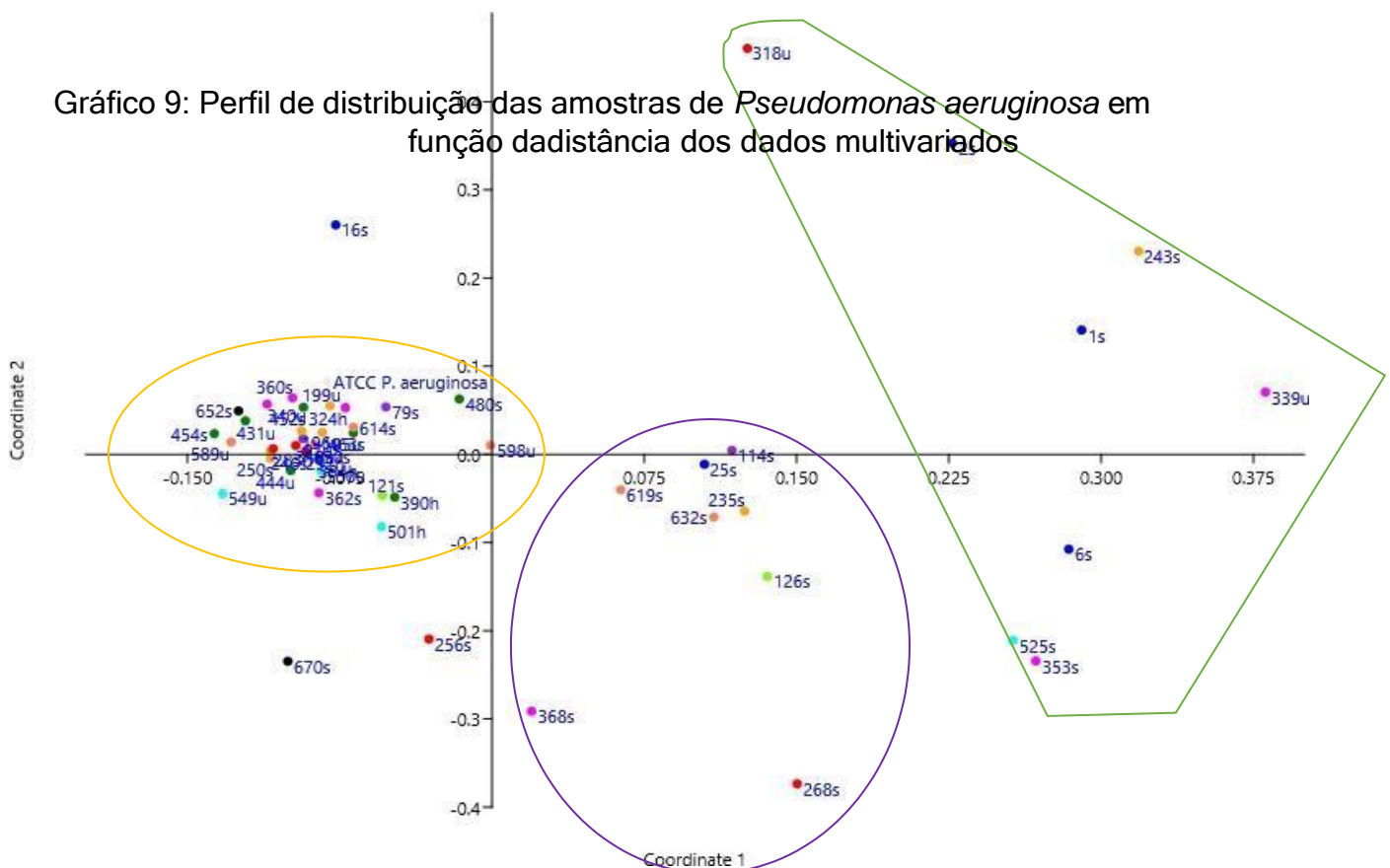
Quadro 4: Legenda de cores correspondentes às datas de coletas das amostras

	20/11/2019
	22/11/2019
	25/11/2019
	27/11/2019
	29/11/2019
	11/12/2019
	13/12/2019
	16/12/2019
	18/12/2019
	20/12/2019

O gráfico 8 apresenta o perfil de distribuição das amostras de *A. baumannii* gerado pelo programa PAST.

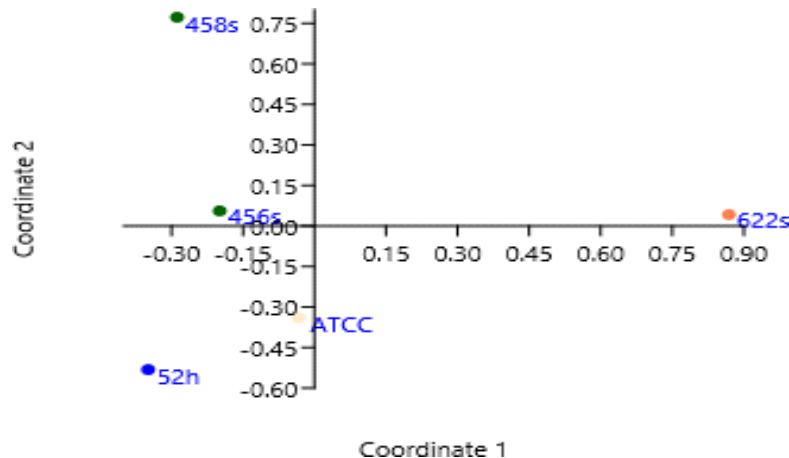
Diante do perfil apresentado na figura acima, três grupos tiveram destaque. No grupo representado pela coloração preta, estão contidas amostras que, diferentemente das demais, não são consideradas multirresistentes, juntamente com a amostra controle (*P. aeruginosa* ATCC 7853). No grupamento de cor vermelha estão as amostras com o perfil de sensibilidade apenas para os antimicrobianos tobramicina, gentamicina e ampicilina-sulbactam, sendo resistentes para os demais. Já no grupo de cor azul, estão incluídas aquelas amostras que são resistentes ou intermediárias para quase todos os antimicrobianos testados.

Gráfico 9: Perfil de distribuição das amostras de *Pseudomonas aeruginosa* em função da distância dos dados multivariados



Com base no perfil demonstrado acima, pode-se destacar três principais grupos. O grupo de amostras pertencentes ao círculo amarelo, incluindo a amostra controle (*P. aeruginosa* ATCC 27853), bactérias que foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados. Em contrapartida, no grupo de coloração verde estão contidas amostras multirresistentes. E, por fim, no grupo de cor roxa estão as amostras com um perfil intermediário de resistência, ou seja, aquelas que apresentaram resistência a alguns antimicrobianos, mas não ao ponto de serem consideradas multirresistentes. As amostras que ficaram de fora de algum grupamento se enquadram no perfil intermediário de resistência, mas devido aos diferentes perfis apresentados por elas, em comparação com as demais, elas acabaram ficando distantes do grupamento ao qual pertencem.

Gráfico 10: Perfil de distribuição das amostras de *Stenotrophomonas maltophilia* em função da distância dos dados multivariados



Pelo fato de *S. maltophilia* apresentar um número amostral muito pequeno, é difícil inferir algum padrão de grupamento nesse tipo de análise estatística. Pode-se dizer que as amostras 456 e 458, que foram coletadas na mesma data e foram isoladas do mesmo sítio de infecção, têm um perfil mais próximo com relação às demais.

6. CONCLUSÕES

Esse estudo teve como objetivo principal caracterizar o perfil de resistência de bastonetes Gram-negativos não fermentadores clinicamente relevantes. Segundo dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), de 2019 até junho de 2021, apenas o município de Belo Horizonte é responsável pelo consumo de mais de 670 mil caixas ou frascos de medicamentos contendo os seguintes princípios ativos e seus derivados: ampicilina; amoxicilina + sulbactam; ceftriaxona; ciprofloxacino; cloridrato de minociclina; cloridrato de tetraciclina; doxiciclina monoidratada; levofloxacino; sulfametoxazol + trimetropim; sulfato de gentamicina; tobramicina. Os princípios ativos supracitados são os mesmos que foram testados no presente estudo, evidenciando o quão comum tem sido a utilização desses fármacos, o que, conseqüentemente, favorece o aumento da resistência bacteriana, uma vez que, de alguma forma, está relacionada à sua capacidade de reagir rapidamente aos desafios impostos pelo uso do fármaco antimicrobiano.

Os β -lactâmicos são a classe de antimicrobianos mais utilizada atualmente, devido sobretudo ao seu espectro de ação, sua elevadíssima toxicidade seletiva e suas características farmacocinéticas. Mas, o uso inadequado desses fármacos vem diminuindo drasticamente sua eficácia, trazendo o risco da sociedade voltar a uma situação que se assemelhe à era pré-antibiótica, pela falta de antimicrobianos com nível de eficiência elevado. *A. baumannii* e *P. aeruginosa* são bactérias Gram-negativas com uma gama de fatores de patogenicidade e uma versatilidade notória em adquirir e disseminar marcadores de resistência a fármacos antimicrobianos de uso clínico. Juntos, esses fatores favorecem a colonização e a instalação da doença infecciosa. O tratamento de infecções causadas por essas bactérias envolve, geralmente, o uso de β -lactâmicos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas, que com o passar do tempo, vêm tendo sua eficácia reduzida. No caso de *S. maltophilia*, a situação é mais crítica, visto que, embora menos frequente que as demais, apresenta resistência intrínseca a vários antimicrobianos. Com isso, as opções terapêuticas são limitadas a alguns agentes antimicrobianos, incluindo trimetropim-sulfametoxazol, levofloxacina, ceftazidima, fluoroquinolonas, ticarcilina-clavulanato e minociclina.

Considerando esse panorama, são de extrema relevância estudos que descrevam a problemática da resistência bacteriana, a fim de que os profissionais de saúde e a população sejam orientados e esclarecidos quanto ao uso correto e racional de antimicrobianos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD EL-BAKY, R. M. *et al.* Antimicrobial resistance pattern and molecular epidemiology of ESBL and MBL producing *Acinetobacter baumannii* isolated from hospitals in Minia, Egypt. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 56, n. 1, p. 4-13, 2020.

ABELLA, J.; BIELEN, A.; HUANG, L.; DELMONT, T. O.; VUJAKLIJA D.; DURAN, R.; CAGNON, C. Integron diversity in marine environments. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 20, p. 15360-15369, 2015.

ADAMS-HADUCH, J. M.; *et al.* Genetic basis of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates at a tertiary medical center in Pennsylvania. **Antimicrobial Agents Chemother**, v. 52, p. 3837- 3843, 2008.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resistência Microbiana- Mecanismos e Impacto Clínico, 2007. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/mecanismos.htm. Acesso em: 30/04/20.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resistência Microbiana – Mecanismos e Impacto Clínico, 2008. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo3/resistencia.htm 2008. Acesso em: 02/09/20.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Venda de medicamentos industrializados, 2021. Disponível em: <https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjoiMjU0ZmY3YTktMzMwNy00MDRkLTk4MGItMWFjYzM0MzMwNDMwIiwidCI6ImI2N2FmMjNmLWZjZjMtNGQzNS04MGM3LWI3MDg1ZjVlZGQ4MSJ9>. Acesso: 22/06/21.

ALGAMMAL, A. M.; MABROK, M.; SIVARAMASAMY, E. *et al.* Emerging MDR-*Pseudomonas aeruginosa* in fish commonly harbor *oprL* and *toxA* virulence genes and *bla*TEM, *bla*CTX-M, and *tetA* antibiotic-resistance genes. **Sci Rep**, v. 10, 2020.

ALSHAMMARI, M. M. M.; ALKHUHAIRY, M. K.; SOGHI, A. A. Prevalence of

aminoglycoside modifying enzyme genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Burn Centers in Iraq. **Drug Invention Today**, v. 11, n. 12, p. 3149- 3154, 2019.

AMOS, G. C. A.; ZHANG, L.; HAWKEY, P. M.; GAZE, W. H.; WELLINGTON, E. M. Functional metagenomic analysis reveals rivers are a reservoir for diverse antibiotic resistance genes. **Veterinary Microbiology**, v. 171, p. 441-447, 2014.

AMOUDIZAJ, F. A.; *et al.* Antibiotic Resistance Pattern and Frequency of PER-1, SHV-1 and AMPC Type B-Lactamase Genes in *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Clinical Samples. **The Open Microbiology Journal**, v. 14, p. 308- 312, 2019.

AN, S.; BERG, G. *Stenotrophomonas maltophilia*. **Trends in Microbiology**, v. 26, n. 7, p. 637-638, 2018.

ANTUNES, L. C. S.; VISCA, P.; TOWNER, K. J. *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. **Oxford Academic**, v. 3, n. 71, p. 292-301, 2014.

ARENAS, M.; *et al.* Mutation an recombination in pathogen evolution: Relevance, methods and controversies. *Infection*, **Genetics and Evolution**, v. 63, p. 295- 306, 2018.

ARTINI, M.; *et al.* Antimicrobial and Antibiofilm Activity and Machine Learning Classification Analysis of Essential Oils from Different Mediterranean Plants against *Pseudomonas aeruginosa*. **Molecules**, v. 23, n. 2, p. 482- 495, 2018.

ARRUDA, C. J. M. *et al.* Revisão Bibliografica De Antibióticos Beta-Lactâmicos. **Revista Saúde em Foco**, v. 11, p. 982- 995, 2019.

AVISON, M. B.; HIGGINS, C. S.; HELDREICH, C. J.; BENNETT, P. M.; WALSH, T. R. Plasmid location and molecular heterogeneity of the L1 and L2 β -lactamase genes of *Stenotrophomonas maltophilia*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 2, p. 413- 419, 2001.

ATTIA, N. M.; ELBADAREI, A. Fluoroquinolone resistance conferred by *gyrA*, *parC* mutations, and *AbaQ* efflux pump among *Acinetobacter baumannii* clinical isolates causing ventilator-associated pneumonia. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 67, n. 4, p. 234- 238, 2020.

- AYOBAMI, O. *et al.* Antibiotic resistance in hospital-acquired ESKAPE-E infections in low-andlower-middle-income countries: a systematic review and meta-analysis. **Emerging Microbes & Infections**, v. 11, p. 443- 451, 2022.
- BALASUBRAMANIAN, D. *et al.* The Regulatory Repertoire of *Pseudomonas aeruginosa* AmpC β -Lactamase Regulator AmpR Includes Virulence Genes. **PlosOne**, v. 3, n. 7, 2012.
- BAPTISTA, M. G. F. M. Mecanismos de resistência aos antibióticos. 2013. Disponível em: <http://recil.grupolusofona.pt/bitstream/handle/10437/3264/Mecanismos%20de%20Resist%C3%Aancia%20aos%20Antibi%C3%B3ticos%20%20Maria%20Galv%C3%A3o%20Ba.pdf?sequence=1>. Acessado em: 06/05/19.
- BARANCHESHME, F.; MUNIR, M. Strategies to Combat Antibiotic Resistance in the Wastewater Treatment Plants. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 2603, 2018.
- BARLETTA, R.; *et al.* *Acinetobacter baumannii* multirresistente: un reto para la terapéutica actual. **MediSur**, v. 16, n. 2, p. 322 — 334, 2018.
- BARTHOLOMEW, T. L.; KIDD, T. J.; PESSOA, J. S.; ÁLVARES, R. C.; BENGOCHEA, J. A. 2-Hydroxylation of *Acinetobacter baumannii* lipid A contributes to virulence. **Infection and Immunity**, v. 87, n. 4, p. 1-17, 2019.
- BAZGIR, Z, N.; *et al.* Phenotypic and Molecular Detection of IMP and SPM Metallo-Beta-Lactamases in Clinical Isolates of Carbapenem Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Research Square**, v. 1, p. 1- 11, 2020.
- BECEIRO, A.; *et al.* Phosphoethanolamine Modification of Lipid A in Colistin- Resistant Variants of *Acinetobacter baumannii* Mediated by the pmrAB Two- Component Regulatory System. **Antimicrobial Agents Chemother**, v. 55, p. 3370- 3379, 2011.
- BERRAZEG, M. *et al.* Mutations in β -Lactamase AmpC Increase Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates to Antipseudomonal Cephalosporins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 10, p. 6248- 6255, 2015.
- BERT, F.; BRANGER, C.; LAMBERT-ZECHOVSKY, N. Identification of PSE and OXA β -lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR–restriction fragment length polymorphism. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 50, n. 1, p. 11-18, 2002.
- BIAGI, M.; *et al.* Activity of Cefiderocol Alone and in Combination with Levofloxacin,

- Minocycline, Polymyxin B, or Trimethoprim-Sulfamethoxazole against Multidrug-Resistant *Stenotrophomonas maltophilia*. **Antimicrobial Agents na Chemotherapy**, v. 64, n. 9, 2020.
- BIGOT, S.; SALCEDO, S. P. The influence of two-partner secretion systems on the virulence of *Acinetobacter baumannii*. **Virulence**, v. 8, p. 1-2, 2017.
- BINET, P.; PORTAL, J. M.; LEYVAL, C. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 32, p. 2011-2017, 2000.
- BLACK, M. T. Novel target sites in bacteria for overcoming antibiotic resistance. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 10, 2005.
- BOJKOVIC, J.; *et al.* Characterization of an *Acinetobacter baumannii* *lptD* Deletion Strain: Permeability Defects and Response to Inhibition of Lipopolysaccharide and Fatty Acid Biosynthesis. **Journal of Bacteriology**. v. 198, n. 4, p. 731-741, 2015.
- BONOMO, R. A.; SZABO, D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n. 2, p. 49-56, 2006.
- BREIDENSTEIN, E. B. M.; FUENTE-NÚÑEZ, C.; HANCOCK, REW. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. **Cell Press**, v.19, n. 8, p. 419–426, 2011.
- BRIONES A. Estimating microbial population counts by “most probable number” using Microsoft Excell. **Journal of Microbiological Methods**, v. 32, p. 272-280, 1999.
- BROOKE, J. S.; BONAVENTURA, G.; BERG, G.; MARTINEZ, J. Editorial: A multidisciplinary look at *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging multi-drug- resistant global opportunistic pathogen. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017.
- BUDIARTI, S.; LINGGA, R.; RUSMANA, I.; WAHYDI, A. T. Antibiotics resistant *Escherichia coli* from hospital liquid waste. **Journal of Applied Biological Sciences**, v. 12, n. 1, p. 36- 40, 2018.
- BURGOYNE, E. D., *et al.* Detection of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing molecules at an electrified liquid|liquid micro-interface through facilitated proton transfer. **Analyst**, v. 145, p. 7000-7008, 2020.
- CARATTOLI, A. Plasmids and the spread of resistance. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n.6, p. 298- 304, 2013.
- CARATTOLI, A.; BERTINI, A.; VILLA, L.; FALBO, V.; HOPKINS, K. L.;

THRELFALL, E. J. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. **Journal of Microbiological Methods**, v.63 n. 3, p. 219-228, 2005.

CARVALHO, K. R. Estudo da diversidade genética, caracterização fenotípica e molecular de mecanismos de resistência a antimicrobianos e virulência em *Acinetobacter baumannii* isolados em hospitais do Rio de Janeiro. 2013. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/8322/2/16.pdf>. Acessado em: 27/04/21.

CHANG, Y.; LIN, C.; CHEN, Y.; HSUEH, P. Update on infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia* with particular attention to resistance mechanisms and therapeutic options. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 2015.

CHEN, J.; LI, H.; YANG, J.; ZHAN, R.; CHEN, A.; YAN, Y. Prevalence and characterization of *integrons* in multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* in Eastern China: a multiple-hospital study. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 12, n. 8, p. 10093- 10105,2015.

CHEN, X.; ZHANG, W.; PAN, W.; YIN, J.; PAN, Z.; GAO, S.; JIAO, X. Prevalence of *qnr*, *aac* (6') - Ib-cr, *qepA*, and *oqxAB* in *Escherichia coli* Isolates from Humans, Animals, and the Environment. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 6, p. 3423- 3427, 2012.

CHIKA, E. et al. Phenotypic Detection of AmpC Beta- Lactamase among Anal *Pseudomonas aeruginosa* Isolates in a Nigerian Abattoir. **Archives of Clinical Microbiology**, v. 2, 2015.

CHU, B. T. T.; PETROVICH, M. L.; CHAUDHARY, A.; WRIGHT, D.; MURPHY, A.; WELLS, G.; PORETSKY, R. Metagenomics Reveals the Impact of Wastewater Treatment Plants on the Dispersal of Microorganisms and Genes in Aquatic Sediments. **American Society for Microbiology**, v. 84, n. 5, 2018.

CLÍMACO, E. C. Análise molecular de mecanismos determinantes de resistência a antibióticos em *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter spp.* 2011. Disponível em: [file:///C:/Users/C%C3%A1ssia%20Lopes/Downloads/Tese_EduardoClimaco%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/C%C3%A1ssia%20Lopes/Downloads/Tese_EduardoClimaco%20(1).pdf). Acessado em: 27/04/19.

Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) M100 Performance Standards For Antimicrobial Susceptibility Testing. 31st ed. 2021.

COHEN, F. L.; TARTASKY, D. Microbial resistance to drug therapy: A review. **State of the Science**, v. 25, p. 51- 64, 1997.

COLQUHOUM, J. M.; RATHER, P. N. Insights Into Mechanisms of Biofilm Formation in *Acinetobacter baumannii* and Implications for Uropathogenesis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.10, n. 253, 2020.

CRUZ-CÓRDOVA *et al.* Antibiotic Resistance, and Virulence Traits of *Stenotrophomonas maltophilia* Strains Associated With an Outbreak in a Mexican Tertiary Care Hospital. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, n. 50, 2020.

CUNNINGHAM, S. A.; NOORIE, T.; MEUNIER, D.; WOODFORD, N.; PATEL, R. Rapid and simultaneous detection of genes encoding *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (bla KPC) and New Delhi metallo- β -lactamase (bla NDM) in Gram- negative bacilli. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 1269- 1271, 2013.

DAVIES, J.; DAVIES D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. **American Society for Microbiology**, v. 74, n. 3, p. 417- 433, 2010.

DELIBERALI, B.; MYIAMOTO, K. N.; NETO, C. H. D. P. W.; PULCINELLI, R. S.R.; AQUINO, A. R. C.; VIZZOTO, B. S.; SANTOS, R. C. V. Prevalence of non-fermenting Gram-negative bacilli among inpatients from Porto Alegre-RS.

Brazilian Journal Pathology and Medical Laboratory, v. 47 n. 5, p. 529-534, 2011.

DEVANEY, K.; SCOTT, L.. The TEPI Project: Searching for Antibiotic Producers in the Soil. **Identifying and Characterizing Novel Antibiotic Producing Microbes From the Soil**, 2022.

DRISCOLL, J. A.; BRODY, S. L.; KOLLEF, M. H. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Drugs**, v. 67, n. 3, p. 351- 368, 2007.

DU, H.; PURI, S.; MCCALL, A.; NORRIS, H. L.; RUSSO, T.; EDGERTON, M. Human Salivary Protein Histatin 5 Has Potent Bactericidal Activity against ESKAPE Pathogens. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, 2017.

EBRAHIMPOUR, M.; NIKOKAR, I.; GHASEMI, Y.; EBRAHIM-SARAIE, H. S.; ARAGHIAN, A.; FARAHBAKHS, M.; GHASSABI, F. Antibiotic resistance and frequency of class 1 integrons among *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from wastewaters of a

burn center in Northern Iran. **Annali di Igiene: Medicina Preventiva e di Comunità**, v. 30, p. 112-119, 2018.

EBRAHIM-SARAIE, H. S. *et al.* Prevalence of antibiotic resistance and integrons, *sul* and *Smqnr* genes in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia* from a tertiary care hospital in Southwest Iran. **Iranian Journal Basic Medical Sciences**, v. 8, n. 22 p. 872– 877, 2019.

ECONOMOU, V.; GOUSIA, P. Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. **Infection and Drug Resistance**, v. 8, n.1, p. 49- 61, 2015.

EDWARDS, P.R. & EWING, W.H. Identification of Enterobacteriaceae, 3rd edition, Publisher: Burgess Pub. Co. 1972.

EJAZ, H. Dissemination of SHV, TEM and CTX-M Genotypes in *Pseudomonas aeruginosa*: A Pre-eminent Reason for Therapeutic Failure in Pediatrics. **Annals of Clinical & Laboratory Science**, v. 50 n. 6, p. 797-805, 2020.

EL-BADAWY, M. F. *et al.* Investigation of six plasmid-mediated quinolone resistance genes among clinical isolates of pseudomonas: a genotypic study in Saudi Arabia. **Infect Drug Resist**, v. 12, p. 915- 923, 2019.

ELIOPOULOS, G. M.; MARAGAKIS, L. L.; PERL, T. M. *Acinetobacter baumannii*: Epidemiology, Antimicrobial Resistance, and Treatment Options. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46. n. 8, p. 1254-1263, 2008.

FALAGAS, M. E. *et al.* Resistance to fosfomycin: Mechanisms, Frequency and Clinical Consequences. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 53, n. 1, p. 22- 28, 2019.

FILHO, F. S. S.; FIUZA, P. O. Drug resistance profile and prevalence of microorganisms isolated from non-hospitalized and hospitalized patients cultures in Campos dos Goytacazes-RJ. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 52, n. 3, p. 275- 280, 2020.

FLUIT, A.C.; SCHMITZ, F.J. Resistance *integrons* and super-*integrons*. **Clinical Microbiology Infections**, v. 10, n. 4, p. 272–288, 2004.

FOX, J. G. *et al.* Intracellular Campylobacter-like organismo from ferrets and hamsters with proliferative bowel disease is a *Desulfovibrio* sp. **Journal Clinical Microbiology**, v. 32, p. 1229- 1237, 1994.

FURLAN, J. P. R.; SILVA, A. P.; STEHLING, E. G. Detecção de *bla* NDM-1 em *Stenotrophomonas maltophilia* isoladas de solo brasileiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 6, 2018.

FURLAN, J. P. R. *et al.* Characterization of Acquired Antimicrobial Resistance Genes in Environmental *Stenotrophomonas maltophilia* Isolates from Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v. 25, n. 4, 2019.

GAETE, M. E.; *et al.* Carbapenemasas en *Pseudomonas aeruginosa* con susceptibilidad disminuida a los carbapenémicos después de una década, desde VIM a KPC. **Revista Chilena de Infectología**, v. 37, n. 4, 2020.

GALETTI, R. Estudo genético e molecular da disseminação da resistência aos β - lactâmicos em *Pseudomonas aeruginosa*. 2014.

GARCÍA-FERNÁNDEZ, S.; *et al.* Detection of Carbapenemase Production in a collection of Enterobacteriaceae with characterized resistance mechanisms from clinical and environmental origins by use of both Carba NP and Blue-Carba tests. **Journal Clinical Microbiology**, v. 54, n. 2, 2016.

GAUTAMA A. Antimicrobial Resistance: The Next Probable Pandemic. **Journal of Nepal Medical Association**, v. 246, p. 225-228, 2022.

GHALY, T. M.; GEOGHEGAN, J. L.; ALROY, J.; GILLINGS, M. R. High diversity and rapid spatial turnover of integron gene cassettes in soil. **Environmental Microbiology**, v. 21, n. 5, p. 1567-1574, 2019.

GIAMARELLOU, H. Multidrug-resistant gram-negative bacteria: how to treat and for how long. **Journal International Antimicrobial Agents**, v. 36, 2010.

GILLESPIE, S. H. Field Challenge Frontiers in Antibiotics. **Journal Frontiers in Antibiotics**, v. 1, 2022.

GORGUN, S.; GUZEL, M.; GUNAL, O.; KILIC, S. S. The Efficiency of Colistin, Minocycline, Tigecycline, and Doxycycline against multidrug-resistant *Acinetobacter* strains. **Annals of Clinical and Analytical Medicine**, 2020.

GROOTE, V. N. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* fosfomicin resistance mechanisms affect non-inherited fluoroquinolone tolerance. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, p. 329-

336, 2011.

GUO, J.; LI, J.; CHEN, H.; BOND, P. L.; YUAN, Z. Metagenomic analysis reveals wastewater treatment plants as hotspots of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements. **Water Research**, v. 123, p. 468- 478, 2017.

GUPTA, S. K.; SHIN, H.; HAN, D.; HUR, H. G.; UNNO, T. Metagenomic analysis reveals the prevalence and persistence of antibiotic- and heavy metal-resistance genes in wastewater treatment plant. **Journal of Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 408- 415, 2018.

HAMMER, Ø.; HARPER, D.A.T.; P. D. RYAN. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, p. 9. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm, 2001.

HANSSON, K.; SUNDSTROM, L.; PELLETIER, A.; ROY, P. H. IntI2 Integron Integrase in Tn7. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 6, p. 1712-1721, 2002.

HAWKEY, P. M. The 2017 Garrod Lecture: Genes, guts and globalization. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 10, p. 2589-2600, 2018.

HUIJIBERS, P. M. C.; BLAAK, H., JONG, M. C. M.; GRAAT E. A. M.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M. J. E.; HUSMAN, A. M. R. Role of the Environment in the Transmission of Antimicrobial Resistance to Humans: A Review. **Environment Science & Technology**, v. 49, n. 20, p. 11993-12004, 2015.

HOCQUET, D.; MULLER, A.; BERTRAND, X. What happens in hospitals does not stay in hospitals: antibiotic-resistant bacteria in hospital wastewater systems. **Journal of Hospital Infection**, v. 93, n. 4, p. 395- 402, 2016.

HOLMES, A. H.; MOORE, L. S.; SUNDSFJORD, A.; STEINBAKK, M.; REGMI, S.; KARKEY, A.; GUERIN, P. J.; PIDDOCK, L. J. V. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. **The Lancet**, v. 387, n. 10014, p. 176-187, 2016.

HONG, D. J.; BAE, I. K.; JANG, I.; JEONG, S. H.; KANG, H.; LEE, K. Epidemiology and Characteristics of Metallo- β -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. **Infection & Chemotherapy**, v. 47, n. 2, p. 81- 97, 2015.

HU, Q.; ZHANG, X. X.; JIA, S.; HUANG, K.; TANG, J.; SHU, P.; YE, L.; REN, H. Metagenomic insights into ultraviolet disinfection effects on antibiotic resistome in biologically treated wastewater. **Water Research**, v. 101, p. 309- 317, 2016.

HU, Y.; et al. Emergence and Expansion of a Carbapenem- Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Clone Are Associated with Plasmid- Borne *bla*KPC- 2 and Virulence-Related Genes. **American Society for Microbiology**, v. 6, n. 3, 2021.

ISLER, B.; DOI, Y.; BONOMO, R. A.; PATERSON, D. L. New Treatment Options against Carbapenem- Resistant *Acinetobacter baumannii* Infections. **Antimicrobial Agents Chemother**, v. 63, n. 1, p. 1-17, 2018.

JACOBY, G. A. AmpC beta-lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 1, p.161– 182, 2009.

JASSIM, Z. M.; ALI, Z. M. Molecular Study Of Antibiotic Resistance Gene In *Pseudomonas aeruginosa* from Different Source. **Plant Archives**, v. 18, n. 2, p. 2617-2623, 2018.

JADIMURTHY, R. *et al.* Escaping mechanisms of ESKAPE pathogens from antibiotics and their targeting by natural compounds. **Biotechnology Reports**, v. 34, p. 728-743, 2022.

JAYOL, A.; NORDMANN, P.; ANDRE, C.; POIREL, L., DUBOIS, V. Evaluation of three broth microdilution systems to determine colistin susceptibility of Gram negative bacilli. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 5, p. 1272-1278, 2018.

JENELLE, C. Surviving and Thriving in the Face of Adversity: Sialic Acid Catabolism and Visa Development in *Staphylococcus aureus*. **Southern Illinois at Carbondale ProQuest Dissertations Publishing**, 2023.

JUTTUKONDA, L. J.; GREEN, E. R.; LONERGAN, Z.; HEFFERN, M. C.; CHANG, A. J.; SKAAR, E. P. *Acinetobacter baumannii* OxyR Regulates the Transcriptional Response to Hydrogen Peroxide. **Infection and Immunity**, v. 87, n. 1, p. 1- 21, 2019.

KANAPATHY, S. *et al.* Sequence-Specific Electrochemical Genosensor for Rapid Detection of *bla*OXA-51-like Gene in *Acinetobacter baumannii*. **Medical Microbiology**, v. 10, p. 1413-1429, 2022.

KARAMANLIOĞLU, D. e DİZBAY, M. In vitro combination of tigecycline with other antibiotics in *Stenotrophomonas maltophilia* isolates. **Turkish Journal of Medical Sciences**, v. 49, p. 683- 686, 2019.

KARKMAN, A.; DO, T. T.; WALSH, F.; VIRTÀ, M. P. J. Antibiotic-Resistance

Genes in Waste Water. **Trends in Microbiology**. v. 26, n. 3, p. 220- 228, 2018.

KARLOWSKY, J. A.; HOBAN, D. J.; HACKEL, M. A.; LOB, S. H.; SAHM, D. F. Resistance among Gram-negative ESKAPE pathogens isolated from hospitalized patients with intra-abdominal and urinary tract infections in Latin American countries: SMART 2013-2015. **Brasilian Journal Infect Diseases**, v. 21, n. 3, p. 343- 348, 2017.

KASHFI, M. *et al.* The Prevalence of Aminoglycoside-Modifying Enzyme Genes Among *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated From Burn Patients. **Archives of Clinical Infectious Diseases**, v. 12, 2017.

KAUSHIK, A.; KAUSHIK. M; LATHER, V.; DUA, J. S. Recent Review on Subclass B1 Metallo- β -lactamases Inhibitors: Sword for Antimicrobial Resistance. **Current Drug Targets**, v. 20, n. 7, p. 756-762, 2019.

KHAN, H. A.; BAIG, F. K.; MEHBOOB, R. Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 5, p. 478-482, 2017.

KHOSRAVI, A. D.; MOTAHAR, M.; MONTAZERI, E. A. The frequency of class1 and 2 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients in a burn center of Ahvaz, Iran. **Plos One**, v. 12, n. 8, 2017.

KIIRU, J.; KARIUKI, S.; GODDEERIS, B. M.; BUTAYE, P. Analysis of β -lactamase phenotypes and carriage of selected β -lactamase genes among *Escherichia coli* strains obtained from Kenyan patients during an 18-year period. **BMC microbiology**, v. 12, n. 1, p. 155, 2012.

KUMAR, A.; THANKAPPAN, B.; JAYARAMAN, A.; GUPTA, A. Evaluation of Antibiotic Tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* for Aminoglycosides and its Predicted Gene Regulations Through In-silico Transcriptomic Analysis. **BioRxiv**, v. 10, 2021.

LAUDY, A. E. *et al.* Prevalence of ESBL-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Warsaw, Poland, detected by various phenotypic and genotypic methods. **PlosOne**, v. 6, n. 12, 2017.

LEITE, GG. C. *et al.* Antimicrobial Combinations against Pan- Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates with Different Resistance Mechanisms. **PLoS One**, v. 11, n. 3, p. 2016.

- LEVY, S. B. Antibiotic Resistance: Consequences of Inaction. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, n. 3, p. 124- 129, 2001.
- LEWIS, K. Persister cells, dormancy and infectious disease. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, p.48–56 2007.
- LEWIS, K. Platforms for antibiotic discovery, v. 12, n. 5, p. 371- 387, 2013.
- LI, A. D.; LI, L. G.; ZHANG, T. Exploring antibiotic resistance genes and metal resistance genes in plasmid metagenomes from wastewater treatment plants. **Frontiers in Microbiology**, v. 24, n. 6, 2015.
- LI, H.; Duan, M.; Gu, J.; Zhang, Y.; Qian, X.; Ma, J.; ZHANG, R.; WANG, X. Effects of bamboo charcoal on antibiotic resistance genes during chicken manure composting. **Ecotoxicology Environmental**, v. 140, p. 1- 6, 2017.
- LI, J.; NATION, R. L.; TURNIDGE, J. D.; MILNE, R. W.; COULTHARD, K.; RAYNER, C. R.; PATERSON, D. L. Colistin: The re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. **Lancet Infectious Diseases**, v. 6, p. 589- 601, 2006.
- LI, L.; HASSAN, A.; BROWN, M. H.; PAULSEN, I. T. Rapid multiplexed phenotypic screening identifies drug resistance functions for three novel efflux pumps in *Acinetobacter baumannii*. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 5, p. 1223-1232, 2016.
- LI, S.; PENG, Y.; RUI, Y. Multiplex real-time PCR assays to detect *Stenotrophomonas maltophilia* carrying *sul1*, *sul2*, and *sul3* genes. **Journal of Microbiological Methods**, v. 156, p. 52-59, 2019.
- LI, X. Z.; LI, J. Antimicrobial Resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*: Mechanisms and Clinical Implications. **Antimicrobial Drug Resistance**, p. 937- 958, 2017.
- LIAKOPOULOS, A.; *et al.* Identification of OXA-23 producing *Acinetobacter baumannii* in Greece, 2010 a 2011. **Euro Surveill**, v. 17, 2012.
- LIU, B; POP, M. ARDB-Antibiotic Resistance Genes Database. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. 443–447, 2009.
- LUND-PALAU, HELENA; *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis: pathophysiological mechanisms and therapeutic approaches. **Expert Review of Respiratory**

Medicine, v. 10, n. 6, p. 685-687, 2016.

LOOD, R.; ERTURK, G.; MATTIASSON, B. Revisiting Antibiotic Resistance Spreading in Wastewater Treatment Plants — Bacteriophages as a Much Neglected Potential Transmission Vehicle. **Frontiers Microbiology**, v. 8, 2017.

LUIZ, S. O. Caracterização Da Resistência De Amostras De *Acinetobacter baumannii* Isoladas No Hospital De Clínicas De Curitiba. 2006. Disponível em: <http://anita.iqm.unicamp.br/CCLaBioSin/Refer%C3%AAs/Ancias/R001.pdf>. Acessado em: 27/04/19.

MAC FADDIN, J. F. Biochemical Testes for Identification of Medical Bacteria. **The Williams & Wilkins Company - Baltimore - U.S.A**, p. 154, 1976.

MAGNET, S.; COURVALIN, P.; LAMBERT, T. Resistance-nodulation-cell division- type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45,n.12, p. 3375- 3380, 2001.

MAHONEY, A. R. Overcoming Antibacterial Resistance Through Synthesis of Small Molecules Targeting Efflux Mechanisms. **Emory University ProQuest Dissertations Publishing**, 2023.

MALEKAN, M., TABARAIE, B., AKHOUNDTABAR, L., AFROUGH, P., and BEHROUZI, A. Distribution of class I integron and *smqnr* resistance gene among *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from clinical samples in Iran. **Avicenna Journal of Medical Biotechnology**, v. 9, 138–141, 2017.

MARTI, E.; JOFRE, J.; BALCAZAR, J. L. Prevalence of antibiotic resistance genes and bacterial community composition in a river influenced by a wastewater treatment plant. **PlosOne**, v. 8, n. 10, 2013.

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; PASCUAL, A.; JACOBY, G. A. Quinolone resistance from a transferable plasmid. **Lancet**, v. 351, p. 797- 799, 1998.

MARTINS-SORENSEN, N. *et al.* A novel plasmid-encoded *mcr-4.3* gene in a colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical strain. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, p. 60- 64, 2020.

MATHERS, A. J.; PEIRANO, G.; PITOUT, J. DD. The Role of Epidemic Resistance

Plasmids and International High-Risk Clones in the Spread of Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 565- 591, 2015.

MATHUR S.; SINGH, R. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, n. 3, p. 281- 295, 2005.

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

MCMILLAN, E. A.; *et al.* Antimicrobial Resistance Genes, Cassettes, and Plasmids Present in *Salmonella enterica* Associated with United States Food Animals. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 832, p. 1-18, 2019.

MENDES, E. T. *et al.* Clinical and microbiological characteristics of patients colonized or infected by *Stenotrophomonas maltophilia*: is resistance to sulfamethoxazole/trimethoprim a problem? **Journal of the São Paulo Institute of Tropical Medicine**, 2020.

MICHIELS, J. E.; BERGH, B. V.; FAUVART M.; MICHIELS, J. Draft genome sequence of *Acinetobacter baumannii* strain NCTC 13423, a multidrug-resistant clinical isolate. **Standards in Genomic Sciences**, v.11, n. 1, 2016.

MIRSALEHIAN, A. *et al.* Detection of AmpC- β -lactamases producing isolates among carbapenem resistant *P. aeruginosa* isolated from burn patient. **Iran Journal Microbiology**, v. 5, n. 6, p. 306- 310, 2014.

MOHAJERI, P.; FARAHANI, A.; MEHRABZADEH, R. S. Molecular Characterization of Multidrug Resistant Strains of *Acinetobacter baumannii* Isolated from Intensive Care Units in West of Iran. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 11, n. 2, 2017.

MOHAMED, M. S. E.; HASSAN, A. T.; AHMED, S. M. K. Prevalence of Class 1, 2, and 3 *Integrans* and Carbapenem Resistance in Gram-negative bacteria. **Egyptian Journal of Medical Microbiology**, v. 25, n. 3, p. 67-73, 2016.

MOUBARECK, C. A.; HALAT, D. H. Insights into *Acinetobacter baumannii*: A Review of Microbiological, Virulence, and Resistance Traits in a Threatening

Nosocomial Pathogen. **Antibiotics**, v. 9, n. 3, 2020.

MOULANA, Z.; BABAZADEH, A.; ESLAMDOST, Z.; SHOKRI, M.; EBRAHIMPOUR, S. Phenotypic and genotypic detection of metallo-beta-lactamases in Carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii*. **Caspian Journal International Medical**, v. 11, n. 2, p. 171- 176, 2020.

MOYNIÉ, L.; *et al.* Structure and Function of the PiuA and PirA Siderophore-Drug Receptors from *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 4, 2017.

MUGNIER, P. D; POIREL, L.; NAAS, T.; NORDMANN, P. Worldwide Dissemination of the *bla* OXA-23 Carbapenemase Gene of *Acinetobacter baumannii* 1. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, p. 35- 40, 2009.

MULCAHY, LR.; ISABELLA, V. M.; LEWIS, K. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms in Disease. **Microbial Ecology**, v. 68, p. 1–12, 2014.

MULANI, M. S.; KAMBLE, E. E.; KUMKAR, S. N.; TAWRE, M. S.; PARDESI, K. R. Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019.

MUNOZ-PRICE, L. S; *et al.* Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. **Lancet Infectious Diseases**, v. 13, p. 785- 796, 2013.

NEMEC, A.; DOLZANI, L.; BRISSE, S.; BROEK, P. V. D.; DIJKSHOORN, L. Diversity of aminoglycoside-resistance genes and their association with class 1 *integrons* among strains of pan-European *Acinetobacter baumannii* clones. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, n. 12, p. 1233-1240, 2004.

NIE, D. *et al.* Outer membrane protein A (OmpA) as a potential therapeutic target for *Acinetobacter baumannii* infection. **Journal of Biomedical Science**, v. 27, n. 26, 2020.

NIKAIDO, H.; PAGÈS, J-M. Broad specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of Gram negative bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 2, p. 340-363, 2012.

- NOVOVIC, K.; D.; MALESEVIC, M. J.; FILIPIC, B. V.; MIRKOVIC, N. L.; MILIJKOVIC, M. S.; KOJIC, M. O.; JOVCIC, B. U. Psa Regulator Connects Cell Physiology and Class 1 Integron Integrase Gene Expression Through the Regulation of *lexA* Gene Expression in *Pseudomonas* spp. **Current Microbiology**, v. 76, n. 3, p. 320- 328, 2019.
- NOWAK, P.; PALUCHOWSKA, P.; BUDAK, A. Distribution of blaOXA genes among carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* nosocomial strains in Poland. **New Microbiologica**, v. 35, p. 317- 325, 2012.
- MCCRADY, Mac H. The numerical interpretation of fermentation-tube results. **Journal Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 183-212, 1915.
- O'DRISCOLL, N.; CUSHNIE, T. P. T.; MATTHEWS, K. H.; LAMB, A. J. Colistin causes profound morphological alteration but minimal cytoplasmic membrane perforation in populations of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Archives of Microbiology**, v. 200, N. 5, P. 793- 802, 2018.
- O'NEILL, J. Review on Antimicrobial Resistance. Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations. **The Review on Antimicrobial Resistance**, 2014. Disponível em: <http://amr-review.org>. Acesso em: 29/04/19.
- OLIVER, A.; MULET, X.; LÓPEZ-CAUSAPÉ, C.; JUAN, C. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high- risk clones. **Drugs Resistance Updates**, v. 21- 22, p. 41- 59, 2015.
- OLIVEIRA, M. E. F.; ARAÚJO, D. G.; OLIVEIRA, S. R. Resistance of non-fermenting Gram-negative bacilli isolated from blood cultures from an emergency hospital. **Brazian Journal of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 53, n. 2, 2017.
- OLSVIK, O.; STROCKBINE, N.A. PCR Detection of Heat-Stable, Heat-Labile, and Shiga-Like Toxin Genes in *Escherichia coli*. In: PERSING, D.H.; SMITH, T.F.; TENOVER, F.C.; WHITE, T.J. **Diagnostic Molecular Microbiology**, Washington: ASM, p. 271-276, 1993.
- OPAZO, A.; DOMÍNGUEZ, M.; BELLO, H.; AMYES, S.; GONZÁLES-ROCHA, G. OXA-type carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* in South America.

Journal Infectious Dev Ctries, v. 6, n. 4, p. 311- 316, 2012.

OZ T, GUVENEK A, YILDIZ S, KARABOGA E, TAMER YT, MUMCUYAN N, OZAN VB, SENTURK GH, COKOL M, YEH P, TOPRAK E. Strength of selection pressure is an important parameter contributing to the complexity of antibiotic resistance evolution. **Molecular Biology Evolution**, v. 31, n. 9, p. 2387-2401, 2014.

PAGANO, M. Avaliação de elementos genéticos móveis e sua associação com a resistência em *Acinetobacter baumannii*. 2012. Disponível em: <http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/61789/000827846.pdf?sequence=> Acessado em: 27/04/19.

PAGANO, M.; MARTINS, A. F.; BARTH, A. L. Mobile genetic elements related to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 785-792, 2016.

PARSEK, M.R.; GREENBERG, E.P. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in Gram-negative bacteria: A signaling mechanism involved in associations with higher organisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 16, p. 8789-8793, 2000.

PARTRIDGE, S. R.; KWONG, S. M.; FIRTH, N.; JENSEN, S. O. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, 2018.

PELEG, A. Y.; SEIFERT, H., PATERSON, D. L. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 3, p. 358-382, 2008.

PEREIRA A. L.; PITA, J. R. Alexander Fleming (1881-1955). Da descoberta da penicilina (1928) ao premio Nobel (1945). **Revista da Faculdade de Letras**, v. 6, p. 129-151, 2005.

PEREIRA, C. A. S.; ALVARENGA, J.; BARROS, A. L.; SILVA, A. O.; Pesquisa de bacilos gram negativos não fermentadores presente em torneiras de um hospital privado do município de volta redonda, RJ. **Revista Episteme Transversalis**, v. 3, n. 1, 2012.

PEREIRA, M. O. Caracterização fenotípica e genotípica de *Acinetobacter* spp. e

Pseudomonas aeruginosa produtoras de carbapenemases. 2017.

PEREIRA, S. G.; ROSA, A. C.; FERREIRA, A. S.; MOREIRA, L. M.; PROENÇA, A. N.; MORAIS, P. V.; CARDOSO, O. Virulence factors and infection ability of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a hydrophobic facility and respiratory infections. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, p. 1359-1368, 2014.

PEREIRA, S. G.; MARQUES, M.; PEREIRA, J.; CARDOSO, O. Multidrug and Extensive Drug Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates from a Portuguese Central Hospital: 10-Year Survey. **Microbial Drug Resistance**, v. 21, n. 2, p. 194-200, 2015.

PEREIRA, S. G.; ROSA, A. C.; CARDOSO, O. Virulence factors as predictive tools for drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Virulence**, v. 6, n.7, p. 679–683, 2015.

PEREZ, F.; HUJER, A. M.; HUJER, K. M.; DECKER, B. K.; RATHER, P. N.; BONOMO, R. A. Global Challenge of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. **American Society for Microbiology**, v. 51, n. 10, p. 3471-3484, 2007.

PICÓ, Y. e BARCELÓ, D. Transformation products of emerging contaminants in the environment and high-resolution mass spectrometry: a new horizon. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 21, p. 6257- 6273, 2015.

POIREL, L. *et al.* BEL-1, a Novel Clavulanic Acid-Inhibited Extended-Spectrum - Lactamase, and the Class 1 Integron In120 in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, n. 9, p. 3743- 3748, 2005.

POIREL, L.; NORDMANN, P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. **Wiley Online Library**, v. 12, n. 9, p. 826-836, 2006.

PORMOHAMMAD, A.; POURIAN, R.; AZIMI, H.; GOUDARZI, M. Prevalence of *integron* classes in Gram-negative clinical isolated bacteria in Iran: a systematic review and meta-analysis. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 22, n. 2, p. 118-127, 2019.

POURNARAS, S., *et al.* Predominance of international clone 2 OXA-23-producing-*Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Greece, 2015: results of a nationwide

study. **International Journal Antimicrobial**, v. 49, p. 749- 753, 2017.

PUZARI, M.; CHETIA, P. RND efflux pump mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*: a major issue worldwide. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 24, p. 1- 8, 2017.

QUEENAN A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: as beta-lactamases versáteis. **Clinical Microbiology Review**, v. 20, p. 440-458, 2007.

RAMIREZ, M. S.; BONOMO, R. A.; TOLMASKY, M. E. Carbapenemases: Transforming *Acinetobacter baumannii* into a Yet More Dangerous Menace. **Biomolecules**, v. 10, n. 5, 2020.

REBELO, A. R. *et al.* Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for surveillance purposes. **Euro Surveill**, v. 6, 2018.

RICE L B. Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAP. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 197, p. 1079-1081, 2008.

RIDENHOUR, B. J.; METZGER, G. A.; FRANÇA, M.; GLINIEWICZ, K.; MILLSTEIN, J.; FORNEY, L. J.; TOPO, E. M. Persistence of antibiotic resistance plasmids in bacterial biofilms. **Evolutionary Applications**, v. 10, n. 6, p. 640-647, 2017.

ROBERTS, M. C.; SUTCLIFFE, J.; COURVALIN, P.; JENSEN, L. B.; ROOD, J.; SEPPALA, H. Nomenclature for Macrolide and Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B Resistance Determinants. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 12, p. 2833- 2830, 1999.

ROCA, I.; ESPINAL, P.; VILA-FARRÉS, X.; VILA, J. The *Acinetobacter baumannii* oxymoron: comensal hospital dweller turned pan-drug-resistant menace. In: **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n.148, p. 40-66, 2012.

ROCA, I.; *et al.* The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. **New Microbes and New Infections**. v. 6, p. 22- 29, 2015.

- ROCHA, A. J. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa*: Fatores de Virulência e Genes de Resistência a Antibióticos. **Brazilian Archives Biology Technology**, v. 62, n.9, 2009.
- RODRIGUEZ, R.; BUSTILLO, D.; CAICEDO, D.; CADENA, D.; CASTELLANOS, C. *Acinetobacter baumannii*: patógeno multirresistente emergente. **Méd UIS**, v. 29, n. 2, p. 113 — 135, 2016.
- ROIAS, C. - Beta-lactamase AmpC: atualização do diagnóstico laboratorial e estratégia terapêutica. Dissertação de Mestrado, Lisboa, 2017.
- ROWE, W.; VERNER-JEFFREYS, D. W.; BAKER-AUSTIN, C.; RYAN, J. J.; MASKELL, D. J.; PEARCE, G. P. Comparative metagenomics reveals a diverse range of antimicrobial resistance genes in effluents entering a river catchment. **Water Science Technology**, v. 73, p. 1541 — 1549, 2016.
- RUMBAUGH, K. P.; GRISWOLD, J. A.; HAMOOD, A. N. The role of quorum sensing in the in vivo virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbes and Infection** 2, v. 5, p. 1721-1731, 2000.
- RUPPÉ, E.; WOERTHER, P. L.; BARBIER, F. Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. **Annals of Intensive Care**, v.5, n. 21, 2015.
- SALLEM, S e BOKHARI H. Resistance profile of genetically distinct clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates from public hospitals in central Pakistan. **Journal of Infection and Public Health**, v. 13, n. 4, p. 598- 605, 2020.
- SÁNCHEZ, M. B. *et al.* Predictive analysis of transmissible quinolone resistance indicates *Stenotrophomonas maltophilia* as a potential source of a novel family of Qnr determinants. **BMC Microbiology**, v. 8, n. 148, 2008.
- SÁNCHEZ, M. B. Antibiotic resistance in the opportunistic pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. **Frontiers in Microbiology**. 2015.
- SANDERSON, H.; FRICKER, C.; BROWN, R. S.; MAJURY, A.; LISS, S. N. Antibiotic resistance genes as an emerging environmental contaminant. **Environmental Reviews**, v. 24, p. 205- 218, 2016.
- SANTAJIT, S.; INDRAWATTANA, N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in

ESKAPE Pathogens. **Biomed Research International**, v. 2016.

SHABBAN, M.; *et al.* Resistance to Colistin Mediated by *mcr-1* among Multidrug Resistant Gram Negative Pathogens at a Tertiary Care Hospital, Egypt. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 14, n. 2, p. 1125- 1132, 2020.

SHARMA, V. K.; JOHNSON, N.; CIZMAS, L.; MCDONALD, T. J.; KIM, H. A review of the influence of treatment strategies on antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes. **Chemosphere**, v. 150, p. 702- 714, 2016.

SHARPE, M. High on pollution: drugs as environmental contaminants. **Journal Environmental Monitor**, v.5, n. 3, p. 42- 46, 2003.

SHOUSHA, A. *et al.* Bacteriophages Isolated from Chicken Meat and the Horizontal Transfer of Antimicrobial Resistance Genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 14, p. 4600- 4006, 2015.

SILVA, G. J.; CORREIA, M.; VITAL, C.; RIBEIRO, G.; SOUSA, J. C.; LEITÃO, R.; PEIXE, L.; DUARTE, A. Molecular characterization of *blaIMP-5*, a new *integron*- borne metallo- β -lactamase gene from an *Acinetobacter baumannii* nosocomial isolate in Portugal. **Oxford Academy**, v. 215, n. 1, p. 33-39, 2006.

SILVA, A. O.; ALVARENGA, J.; GUEDES, M. R. A.; FIRMINO, R.; PEREIRA, C. A. S. Research of non-fermenting Gram negative bacilli isolated from the interior of taps bodies of a private hospital unit. **Brazilian Journal of Clinical Analyses**, v. 44, n. 12, p. 1577- 1584, 2015.

SINGH, R. K. M., Pal, N. K., Banerjee, M., Sarkar, S., Saha, P., SenGupta, M. A simplified method of Three Dimensional technique for the detection of AmpC betalactamases. **Archives of Clinical Microbiology**, v. 3, p. 1-7, 2013.

SIQUEIRA, F. S. Mecanismos de resistência a β - Lactâmicos em *Pseudomonas aeruginosa*. **Revista do Biomédico**, p, 24, 2002.

SOUZA, L. C. R.; BEZERRA, N. V.; TRINDADE, E. L. Aspectos epidemiológicos de *Acinetobacter baumannii* e avaliação do perfil de resistência em amostras biológicas de pacientes atendidos em um hospital oncológico em Belém-PA. **Revista SALUS**, v. 3, n. 1, p. 49-55, 2021.

- STOKES, H. W.; HALL, R. M. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. **Wiley Online Library**, v. 3, n. 12, p. 1669-1683, 1989.
- STOVER, C. K. *et al.* Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. **Nature**, v. 406, p. 959-964, 2000.
- STRATEVA, T.; YORDANOV, D. - *Pseudomonas aeruginosa* - A phenomenon of bacterial resistance. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. 9, p. 1133- 1148, 2009.
- SU, S. Y.; LIN, JY.; CHU, C.; SU, LH.; LIN, TY.; CHIU, CH. Resistência ao imipenem associada ao integron em *Acinetobacter baumannii* isolado de um hospital regional em Taiwan. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 27, p. 81- 84, 2006.
- SUBIRATS, J.; TIMONER, X.; SÀNCHEZ-MELSIÓ, A.; BALCÁZAR, J. L.; ACUÑA, V.; SABATER, S.; BORREGO, C. M. Emerging contaminants and nutrients synergistically affect the spread of class 1 integron-integrase (*intI1*) and *sulI* genes within stable streambed bacterial communities. **Water Research**, v. 138, p. 77- 85, 2018.
- SUZUKI S, HORINOUCI T, FURUSAWA C. Prediction of antibiotic resistance by gene expression profiles. **Nature Communications**, v. 5, 2014.
- TACCONELLI, E. *et al.* Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic resistant bacteria and tuberculosis. **Lancet Infect**, v. 18, p. 318-327, 2018.
- TADA, T.; SHRESTHA, S.; SHIMADA, K.; OHARA, H.; SHERCHAND, J. B.; POKHREL, B. M.; KIRIKAE, T. PER-8, a Novel Extended-Spectrum β -Lactamase PER Variant, from an *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolate in Nepal. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 3, 2017.
- TAKANO, C. *et al.* Development of a Novel Loop-Mediated Isothermal Amplification Method to Detect Guiana Extended-Spectrum (GES) β -Lactamase Genes in *Pseudomonas aeruginosa*. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, article 25, 2019.

TANG, J.; BU, Y.; ZHANG, X. X.; HUANG, K.; ELE, X.; YE, L.; SHAN, Z.; REN, H. Metagenomic analysis of bacterial community composition and antibiotic resistance genes in a wastewater treatment plant and its receiving surface water. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 132, p. 260- 269, 2016.

TAVARES, A. B. T. *Pseudomonas aeruginosa* e Resistência aos BetaLactâmicos, Aminoglicosídeos e Fluoroquinolonas. 2020. Disponível em: <https://estudogeral.uc.pt/bitstream/10316/92978/1/Documento%20U%cc%81nico%20-%20Ba%cc%81rbara%20Tavares.pdf>

Temocin, F.; Erdinc, F.S.; Tulek, N.; Demirelli, M.; Ertem, G.; Kinikli, S.; Koksall, E. Synergistic effects of sulbactam in multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 46, p. 1119- 1124, 2015.

TINDALL; SUTTON; GARRITY. *Enterobacter aerogenes* Hormaeche and Edwards 1960 (Approved Lists 1980) and *Klebsiella mobilis* Bascomb *et al.* 1971 (Approved Lists 1980) share the same nomenclatural type (ATCC 13048) on the Approved Lists and are homotypic synonyms, with consequences for the name *Klebsiella mobilis* Bascomb *et al.* 1971 (Approved Lists 1980). **International Journal System Evolution Microbiology**, v.67, n. 2, p. 502- 504, 2017.

TRINH, L. P.; TA, V. S.; LUU, T. N. H.; NGUYEN, M. P.; DINH, T. H.; NGUYEN, V. H.; DOAN, T. H.; PHAM, B. Y. Studies of common antibiotic resistance-associated genes of *Acinetobacter baumannii*. **Life Sciences**, v. 61, n. 1, p. 58-61, 2018.

TSENG, B. S.; REICCHARD, C.; MERRIHEW, G. E.; ARAUJO-HERNANDEZ, S. A.; HARRISON, J. J.; MACCOSS, M. J.; PARSEK, M. R. A Biofilm Matrix-Associated Protease Inhibitor Protects *Pseudomonas aeruginosa* from Proteolytic Attack. **American Society for Microbiology**, v. 9, n. 2, 2018.

VARGIU, A. V.; POS, K. M.; POOLE, K.; NIKAIDO, H. Editorial: bad bugs in the XXIst century: resistance mediated by multi-drug efflux pumps in Gram-negative bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 833, 2016.

VÁSQUEZ-LÓPEZ, R. *et al.* *Acinetobacter baumannii* Resistance: A Real Challenge for Clinicians. **Antibiotics**, v. 9, n. 4, 2020.

VON WINTERSDORFF , C. J. H.; PENDERS, J.; VAN NIEKERK, J. M.; MILLIS,

- N. D.; MAJUMDER, S.; VAN ALPHEN, L. B.; SAVELKOUL, P. H. M.; WOLFFS, P. F. G. Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 173, p. 1-10, 2016.
- XIA, W.; XU, T.; QIN, T.; LI, P.; LIU, Y.; KANG, H.; GU, B.; MA, P. Characterization of *integrons* and novel cassette arrays in bacteria from clinical isolates in China, 2000-2014. **The Journal of Biomedical Research**, v. 30, n. 4, p. 292-303, 2016.
- XU, T.; WANG, J.; YING, J.; ZHU, T.; LIU, Y.; XU, L.; LI, P.; LI, P.; YING, J.; LI, K.; YI, H.; LU, J.; HU, Y.; ZHOU, T.; BAO, Q. Characterization of a class 1 integron associated with the formation of quadruple *bla*GES-5 cassettes from an IncP-1 β group plasmid in *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 52, n. 4, p. 485- 491, 2018.
- XU, Y.; NIU, H.; HU, T.; ZHANG, L.; SU, S.; HE, H.; WANG, H.; ZHANG, D. High Expression of Metallo- β -Lactamase Contributed to the Resistance to Carbapenem in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Baotou, China. **Infect Drug Resist**, v. 13, p. 35-43, 2020.
- WANG, Q.; *et al.* Risk factors and clinical outcomes for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae nosocomial infections. **European Journal Clinical Microbiology Infectious Diseases**, v. 35, n. 10, p. 1679-89, 2016.
- WASAN, H.; SINGH, D.; REETA, K. H.; GUPTA, Y. K. Landscape of Push Funding in Antibiotic Research: Current Status and Way Forward. **Biology**, v. 12, p. 101-123, 2023.
- WHO ten threats to global health in 2019. Disponível em: <https://www.who.int/emergencies/ten-threats-to-global-health-in-2019>. Acesso em: 26/04/19.
- WHO SCIENTIFIC WORKING GROUP. Antimicrobial resistance. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 63, n.3, p. 383- 394, 1983.
- WOODFORD N, ELLINGTON MJ, COELHO JM, TURTON JF, WARD ME, BROWN S, AMYES SG, LIVERMORE DM. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 27, n. 4, p. 351-353, 2006.

WRIGHT, G. D.; POINAR, H. Antibiotic resistance is ancient: implications for drug Discovery. **Trends in Microbiology**, v. 20, n. 4, p. 157-159, 2012.

WU, R. X.; *et al.* Emergence of concurrent levofloxacin- and trimethoprim/sulfamethoxazole-resistant *Stenotrophomonas maltophilia*: Risk factors and antimicrobial sensitivity pattern analysis from a single medical center in Taiwan. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, 2020.

YIGIT, H.; *et al.* Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents Chemother**, v. 45, p. 1151- 1161, 2001.

YONG D, TOLEMAN MA, GISKE CG, CHO HS, SUNDAMAN K, LEE K. Characterization of a new *metallo-beta-lactamase* gene, bla (NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 53, n. 12, p. 5046-54, 2009.

ZAFFIRI, L.; GARDNER, J.; TOLEDO-PEREYRA, L. H. History of Antibiotics. From Salvarsan to Cephalosporins. **Journal of Investigative Surgery**, v. 25, p. 67-77, 2012.

ZAVASCKI, A. P.; CARVALHAES, C. G.; PICÃO, R. C.; GALES, A. C. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. **Journal Expert Review of Anti- infective Therapy**, v. 8, n. 1, p. 71-93, 2010.

ZHANG J, ZHENG B, ZHAO L, WEI Z, JI J, LI L, XIAO Y. Nationwide high prevalence of CTX-M and an increase of CTX-M-55 in *Escherichia coli* isolated from patients with community-onset infections in Chinese county hospitals. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, 2020.

8. ANEXO

Quadro 5: Lista de primers, condições de reação e tamanho do amplicons para cada gene

Classe dos antimicrobianos	Gene	Primer (5' - 3')	Condições de reação	Amplicon (pb)	Referências
Carbapenêmic os	<i>blaKPC-2</i>	F: ATG TCA CTG TAT CGC CGT CT R: TTT TCA GAG CCT TAC TGC CC	94 °C/5 min - 94 °C/1 min, 56 °C/1 min, 72 °C/1 min (30x) - 72 °C/5 min	533	Jones <i>et al.</i> , 2009
	<i>blaNDM-1</i>	F: GGG CAG TCG CTT ACG GT R: GTA GTC CTC AGT GTC GGC AT	94°C/3 min – 94°C/30 seg, 60°C/30 seg, 72°C/30 seg (30x) – 72°C/3 min	477	Saleem e Bokhari, 2019
	<i>blaIMP</i>	F: TTG GAA AAT TAT ATA ATC CC R: CCA AAC CAC TAG GTT ATC	94°C/5 min – 94°C/20 seg, 76°C/45 seg, 72°C/30 seg (35x) – 72°C/3 min	188	Leite <i>et al.</i> , 2016 e Mendes <i>et al.</i> , 2007

<i>bla</i> VIM	F: AGT GGT GAG TAT CCG ACA GR: ATG AAA GTG CGT GGA GAC	94 °C/5 min - 94 °C/30 seg, 55 °C/30 seg, 72°C/30 seg (30x) - 72 °C/5 min	261	Gröbner <i>et al.</i> , 2009e Azim <i>et</i> <i>al.</i> , 2010 (adaptado)
<i>bla</i> OXA-48	F: AAA TCA CAG GGC GTA GTT GTG R: GAC CCA CCA GCC AAT CTT AG	94 °C/5 min - 94 °C/1 min, 53 °C/1 min, 72 °C/1 min (30x) - 72 °C/5 min	555	Gröbner <i>et al.</i> , 2009 (adaptado)

	<i>blaOXA-58</i>	F: AAG TAT TGG GGC TTG TGC TGR: CCC CTC TGC GCT CTA CAT AC	95°C/ 5 min - 95°C/ 45 seg, 56°C/ 45 seg, 72°C/ 3 min (35x) - 72°C/ 5 min	599	Nowak, Paluchowska e Budak, 2012
	<i>blaOXA-23</i>	F: GAT CGG ATT GGA GAA CCA GAR: ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT	95°C/ 5 min - 95°C/ 45 seg, 56°C/ 45 seg, 72°C/ 3 min (35x) - 72°C/ 5 min	501	Nowak, Paluchowska e Budak, 2012
	<i>blaOXA-143</i>	F: AGT TAA CTT TCA ATA ATT G R: TTG GAA AAT TAT ATA ATC CC	95°C/ 5 min - 95°C/ 45 seg, 56°C / 45seg, 72°C/ 3 min (35x) - 72°C/ 5 min	604	Leite <i>et al.</i> , 2016
	<i>blaSPM</i>	F: CCT ACA ATC TAA CGG CGA CC R: TCG CCG TGT CCA GGT ATA AC	95°C/ 5 min — 95°C/ 1 min, 51°C/ 1 min, 68°C/ 1 min (30x) – 68°C/ 5 min	649	Hassuna <i>et al.</i> , 2020
	<i>blaGIM</i>	F: TCG ACA CAC CTT GGT CTG AA R: AAC TTC CAA CTT TGC CAT GC	94 °C/5 min - 94 °C/1 min, 55 °C/1 min, 72 °C/1 min (30x) - 72 °C/5 min	477	Ellington <i>et al.</i> , 2007

	<i>blaSIM</i>	F: TAC AAG GGA TTC GGC ATC G R: TAA TGG CCT GTT CCC ATG TG	94°C/5 min - 94 °C/1 min, 60 °C/45 seg, 72°C/1 min (30x) – 72°C/7 min	741	Xu <i>et al.</i> , 2020
ESBLs	<i>blaSHV</i>	F: GCA AAA CGC CGG GTT ATT C R: GGT TAG CGT TGC CAG TGC T	95 °C/5 min - 95 °C/30 seg, 55 °C/30 seg, 72 °C/1 min (35x) - 72°C/5 min	940	Gröbner <i>et al.</i> , 2009 (adaptado)
	<i>blaTEM</i>	F: GTG CGC GGA ACC CCT ATT R: TTA CCA ATG CTT AAT CAG TGA GGC	94 °C/5 min - 94 °C/1 min, 56 °C/1 min, 72 °C/1 min (30x) - 72 °C/5 min	968	Jones <i>et al.</i> , 2009

	<i>bla</i> CTX-M	F: TTT GCG ATG TGC AGT ACC AGT AA R: CTC CGC TGC CGG TTT TAT C	94 °C/5 min - 94 °C/1 min, 54 °C/1 min, 72 °C/1 min (30x) - 72 °C/5 min	520	Abe <i>et al.</i> , 2017
	<i>bla</i> BEL-1	F: CGA CAA TGC CGC AGC TAA CC R: CAG AAG CAA TTA ATA ACG CCC	94 °C/1 min - 94 °C/ 30 seg, 55°C/ 30seg, 72 °C/ 1 min (30x) - 72°C/ 10 min	488	Poirel <i>et al.</i> , 2005
	<i>bla</i> GES	F: CTA TTA CTG GCA GGG ATC G R: CCT CTC AAT GGT GTG GGT	94 °C/1 min - 94 °C/ 30 seg, 55°C/30 seg, 72 °C/1 min (30x) - 72 °C/15 min	594	Takano <i>et al.</i> , 2019
Fluoroquinolonas	<i>qnrA</i>	F: AGA GGA TTT CTC ACG CCA GG R: TGC CAG GCA CAG ATC TTG AC	95 °C/10 min - 95 °C/ 1 min, 54°C/1 min, 72 °C/1 min (35x) - 72 °C/10 min	580	Cattoir <i>et al.</i> , 2007
	<i>qnrB</i>	F: GGM ATH GAA ATT CGC CAC TG R: TTT GCY GYY CGC CAG TCG AA*	95 °C/10 min - 95 °C/ 1 min, 54°C/1 min, 72 °C/1 min (35x) - 72 °C/10 min	264	Cattoir <i>et al.</i> , 2007
	<i>qnrS</i>	F: GCA AGT TCA TTG AAC AGG GT R: TCT AAA CCG TCG AGT TCG GCG	95 °C/10 min - 95 °C/ 1 min, 54°C/1 min, 72 °C/1 min (35x) - 72 °C/10 min	428	Cattoir <i>et al.</i> , 2007

<i>qepA</i>	F: CTG CAG GTA CTG CGT CAT G R: CGT GTT GCT GGA GTT CTT C	94°C/5 min - 94 °C/1 min, 60 °C/1 min, 72 °C/1 min (30x) - 72 °C/5 min	403	Chen <i>et al.</i> , 2012
<i>oqxA</i>	F: GAC AGC GTC GCA CAG AAT G R: GGA GACG AGG TTG GTA TGG A	94°C/5 min - 94 °C/1 min, 62 °C/1 min, 72 °C/1 min (30x) - 72 °C/5 min	339	Chen <i>et al.</i> , 2012
<i>oqxB</i>	F: CGA AGA AAG ACC TCC CTA CCC	94°C/5 min - 94 °C/1 min, 62 °C/1 min,	240	Chen <i>et al.</i> , 2012

		R: CGC CGC CAA TGA GAT ACA	72 °C/1 min (30x) - 72 °C/5 min		
Sulfonamidas	<i>sul-1</i>	F: CGG CGT GGG CTA CCT GAA CG R: GCC GAT CGC GTG AAG TTC CG	94 °C/ 5 min - 94 °C/ 15 seg, 69°C/ 30seg, 72 °C/1 min (30x) - 72 °C/ 7 min	433	Kürekci <i>et al.</i> , 2017
	<i>sul-2</i>	F: GCG CTC AAG GCA GAT GGC ATT R: GCG TTT GAT ACC GGC ACC CGT	94 °C/ 5 min - 94 °C/ 15 seg, 69°C/ 30seg, 72 °C/1 min (30x) - 72 °C/7 min	293	Kürekci <i>et al.</i> , 2017
	<i>sul-3</i>	F: GAG CAA GAT TTT TGG AAT CG R: CTA ACC TAG GGC TTT GGA TAT	94 °C/ 5 min - 94 °C/ 15 seg, 69°C/ 30seg, 72 °C/1 min (30x) - 72 °C/ 7 min	750	Kürekci <i>et al.</i> , 2017
Polimixinas	<i>mcr-1</i>	F: CGG TCA GTC CGT TTG TTC R: CTT GGT CGG TCT GTA GGG	94 °C/5 min - 94 °C/30 seg, 58 °C/90 seg, 72 °C/1 min (25x) - 72 °C/10 min	309	Barbieri <i>et al.</i> , 2017
Aminoglicosídeos	<i>aac (6')-Ib-cr</i>	F: TTG CGA TGC TCT ATG AGT GGC TA R: CTC GAA TGC CTG GCG TGT TT	94°C/4 min - 94 °C/45 seg, 55 °C/45 seg, 72 °C/45 seg (40x) - 72 °C/5 min	490	Jassim e Ali, 2018