

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

FRANCISCO JONATHAS RODRIGUES NOGUEIRA

**CARACTERIZAÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA EM BACTÉRIAS
GRAM-NEGATIVAS ISOLADAS DE PACIENTES COM PNEUMONIA**

São Luís

2022

FRANCISCO JONATHAS RODRIGUES NOGUEIRA

**CARACTERIZAÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA EM BACTÉRIAS
GRAM-NEGATIVAS ISOLADAS DE PACIENTES COM PNEUMONIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Afonso Gomes Abreu Junior

São Luís

2022

FRANCISCO JONATHAS RODRIGUES NOGUEIRA

**CARACTERIZAÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA EM BACTÉRIAS
GRAM-NEGATIVAS ISOLADAS DE PACIENTES COM PNEUMONIA**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade
Federal do Maranhão, como requisito
para obtenção do título de Mestre em
Ciências da Saúde.

Prof. Dr. Afonso Gomes Abreu Junior (Orientador)
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Eduardo Martins de Sousa
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Valério Monteiro Neto
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Lídio Gonçalves Lima Neto
Universidade Ceuma

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

NOGUEIRA, FRANCISCO JONATHAS RODRIGUES.

Caracterização de genes de virulência em bactérias gram-negativas isoladas de pacientes com pneumonia / FRANCISCO JONATHAS RODRIGUES NOGUEIRA. - 2022.

71 p.

Orientador(a): AFONSO GOMES ABREU.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, SÃO LUÍS, 2022.

1. Bactérias Gram-negativas. 2. Fatores de virulência aos antimicrobianos. 3. Patógenos. 4. Pneumonia. I. ABREU, AFONSO GOMES. II. Título.

“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, eles são a abertura para achar as que estão certas”.

Carl Sagan

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à natureza que nos envolve com todos os seus segredos a serem desvendados, sua característica ímpar, inigualável, que a torna o maior primor deste planeta.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Afonso Gomes Abreu Junior, que me aceitou como seu aluno de iniciação científica em 2016 e me tornou seu aluno de mestrado. Sem dúvidas, uma fonte de ensinamento, dedicação e paciência, além de um grande amigo, que sempre ergueu a mão para me levantar, quando precisei.

À minha família, que apoiou durante meu trajeto na pesquisa científica e me incentivou sempre, torcendo por mim e comemorando todas as pequenas conquistas. Um apoio que sei que posso recorrer sempre que precisar, pois eles sempre estarão de braços abertos.

Às minhas chefas e líderes, Tereza Halabe e Jucelina Ramos Vale, que sempre me apoiou no mestrado e proporcionou flexibilização nos horários, para que eu pudesse participar de reuniões e executar meus experimentos.

Aos colaboradores do Instituto Butantan, especialmente o Prof. Dr. Waldir Elias Pereira Junior e Profa. Dra. Rita de Cássia Ruiz, que me supervisionaram, e ao Msc. Paulo Cesar Gomes Vieira, que me acompanhou nos experimentos.

Aos amigos do Laboratório de Patogenicidade Microbiana da Universidade Ceuma, em especial Raissa Guará Assunção.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) por ter apoiado o projeto ao qual minha dissertação está vinculada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão (PPGCS-UFMA), pela oportunidade a mim concedida de realizar esta etapa da minha vida acadêmica.

À Universidade Federal do Maranhão, por disponibilizar a infraestrutura ao PPGCS.

RESUMO

A pneumonia é uma doença do trato respiratório de caráter agudo e multifatorial, que atinge o parênquima do pulmão, desenvolvendo inflamação de causa infecciosa. É uma doença conhecida por causar diversas internações todos os anos em hospitais, sendo a Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica (PAV ou PAVM) uma das maiores causas de internações e mortes, principalmente em países em desenvolvimento. Diversas bactérias podem causar pneumonia, dentre elas, aquelas pertencentes ao grupo ESKAPE, a exemplo de *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*, que são bactérias que normalmente apresentam resistência a múltiplos antimicrobianos e são um problema para tratar em hospitais. A expressão de genes codificadores de fatores de virulência está muitas vezes ligada à patogenicidade dos microrganismos, sendo alguns exemplos adesinas, toxinas, invasinas, dentre outros. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi caracterizar genes de virulência em bactérias Gram-negativas isoladas de amostras de secreções respiratórias de pacientes com pneumonia internados em UTIs de hospitais de São Luís. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Ceuma, sob o parecer nº 766.690/2014. As amostras de secreção respiratória foram obtidas por conveniência em um laboratório de São Luís, feita sua identificação pelo MALDI-TOF e posterior antibiograma pelos métodos VITEK (automatizado) e Kirby-Bauer (manual, padrão-ouro, também chamado Disco-difusão). O DNA bacteriano foi obtido pelo método de fervura, e posteriormente foi feita a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e eletroforese em gel de agarose. Durante dois meses foram obtidas 135 amostras de secreções traqueais de 129 pacientes internados em UTIs. Destas, um total de 102 eram bactérias Gram-negativas, de 15 espécies, ao todo. A maior parte dos pacientes foi do sexo masculino, com maior frequência de idosos. *A. baumannii* e *P. aeruginosa* foram as mais frequentes, com 35,3% e 29,4%, respectivamente. De modo geral, houve uma maior sensibilidade à amicacina, imipenem, meropenem e polimixina B. No entanto, ambas apresentaram elevadas taxas de resistência a diversos antimicrobianos, incluindo alguns carbapenêmicos. Outros microrganismos, como *Serratia marcescens*, foi totalmente resistente à ampicilina e a *Escherichia coli* apresentou alta resistência à ciprofloxacina. Foram pesquisados 15 genes de virulência de *P. aeruginosa*, sendo *exoS* e *oprI* os mais frequentes, com 70,0% das amostras positivas, seguidos de *phzI* (20,0%), *exoU* (16,7%), *toxA* (13,3%), *phzM* e *exoT* (10,0%), *pilA* e *lasA* (3,3%). Os genes *apr*, *pilB*, *lasB*, *plcH*, *plcN* e *oprL* não foram detectados. Devido a facilidade de transferência genética entre as bactérias, os mesmos genes foram pesquisados em *A. baumannii* e *K. pneumoniae*, mas apenas 1 amostra do gene *oprI* foi positiva para *A. baumannii*. Entretanto, seus efeitos não podem ser ignorados, visto que, aliados aos genes de resistência, são capazes de proliferar com maior facilidade e dificultar o tratamento com drogas antimicrobianas. De maneira geral, o estudo mostrou uma elevada resistência aos antimicrobianos, sendo necessária uma maior atenção nos hospitais, com boa higienização dos próprios profissionais de saúde, no manejo dos pacientes, na prescrição, dispensação e ao administrar os medicamentos nos pacientes, de forma a controlar a resistência bacteriana dentro e fora dos hospitais.

Palavras-chave: patógenos; pneumonia; fatores de virulência aos antimicrobianos; Bactérias Gram-negativas.

ABSTRACT

Pneumonia is an acute and multifactorial respiratory tract disease that affects the lung parenchyma, developing inflammation of an infectious cause. It is a disease known to cause several hospitalizations every year in hospitals, and Ventilator-Associated Pneumonia (VAP or VAP) is one of the biggest causes of hospitalizations and deaths, especially in developing countries. Several bacteria can cause pneumonia, among them those belonging to the ESKAPE group, such as *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*, which are bacteria that normally show resistance to multiple antimicrobials and are a problem to be treated in hospitals. The expression of genes encoding virulence factors is often linked to the pathogenicity of microorganisms, some examples being adhesins, toxins, invasins, among others. Thus, the objective of this work was to characterize virulence genes in Gram-negative bacteria isolated from samples of respiratory secretions from patients with pneumonia admitted to ICUs of hospitals in São Luís. The work was approved by the Research Ethics Committee of Universidade Ceuma, under the opinion nº 766.690/2014. Respiratory secretion samples were obtained for convenience in a laboratory in São Luís, identified by MALDI-TOF and subsequent antibiogram by VITEK (automated) and Kirby-Bauer (manual, gold standard, also called Disc-diffusion) methods. Bacterial DNA was obtained by the boiling method, and then the Polymerase Chain Reaction (PCR) and agarose gel electrophoresis were performed. During two months, 135 samples of tracheal secretions were obtained from 129 patients admitted to ICUs. Of these, a total of 102 were Gram-negative bacteria, from 15 species in total. Most patients were male, with a higher frequency of elderly. *A. Baumannii* and *P. aeruginosa* were the most frequent, with 35.3% and 29.4%, respectively. In general, there was greater sensitivity to amikacin, imipenem, meropenem and polymyxin B. However, both showed high rates of resistance to several antimicrobials, including some carbapenems. Other microorganisms, such as *Serratia marcescens*, were totally resistant to ampicillin and *Escherichia coli* showed high resistance to ciprofloxacin. Fifteen virulence genes of *P. aeruginosa* were investigated, being *exoS* and *oprI* the most frequent, with 70.0% of the positive samples, followed by *phzI* (20.0%), *exoU* (16.7%), *toxA* (13.3%), *phzM* and *exoT* (10.0%), *pilA* and *lasA* (3.3%). The *apr*, *pilB*, *lasB*, *plcH*, *plcN* and *oprL* genes were not detected. Due to the ease of genetic transfer between bacteria, the same genes were investigated in *A. baumannii* and *K. pneumoniae*, but only *oprI* gene was positive for one isolated of *A. baumannii*. However, their effects cannot be ignored, since, combined with resistance genes, they are able to proliferate more easily and make treatment with antimicrobial drugs difficult. In general, the study showed high resistance to antimicrobials, requiring greater attention in hospitals, with good hygiene by the health professionals themselves, in patient management, in prescribing, dispensing and when administering drugs to patients, in order to control bacterial resistance inside and outside hospitals.

Keywords: pathogens; pneumonia; virulence factors to antimicrobial; Gram-negative bacteria.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Primers em estudo com suas respectivas informações para amplificação dos genes.

Tabela 2. Frequência de bactérias Gram-negativas isoladas a partir de amostras de secreção traqueal de pacientes internados em UTIs de hospitais da rede pública e privada de São Luís, MA.

Tabela 3. Perfil de resistência aos antimicrobianos das bactérias Gram-negativas isoladas a partir de amostras de pacientes internados em UTIs de hospitais da rede pública e privada de São Luís, MA.

Tabela 4. Frequência dos genes de virulência que foram testados para a bactéria *P. aeruginosa*.

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPs	Peptídeos Antimicrobianos
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
IACS	Infecções Associadas aos Cuidados de Saúde
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
LPS	Lipopolissacarídeos
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAV / PAVM	Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
QS	<i>Quorum sensing</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UPA	Unidade de pronto atendimento
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 Infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS)	14
2.2 Pneumonia	15
2.3 Principais bactérias Gram-negativas relacionadas	22
2.3.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22
2.3.2 <i>Acinetobacter baumannii</i>	23
2.3.3 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	25
2.3.4 <i>Escherichia coli</i>	26
2.4 Bactérias ESKAPE	27
2.5 Patogenicidade e fatores de virulência	28
3 OBJETIVO	31
3.1 Objetivo geral.....	31
3.2 Objetivos específicos.....	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 Aspectos éticos	32
4.2 Coleta das amostras.....	32
4.3 Identificação e teste de susceptibilidade aos antimicrobianos	32
4.4 Técnicas de biologia molecular	33
4.5 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).....	33
4.6 Eletroforese em gel de agarose	35
5 RESULTADOS	36
6 DISCUSSÃO	40
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
8 CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS	50
ANEXOS	66

1 INTRODUÇÃO

A pneumonia é caracterizada como uma doença respiratória aguda e multifatorial, que acomete o parênquima pulmonar e desenvolve inflamação de causa infecciosa (MATOSO, CASTRO, 2013). Algumas características são os progressivos infiltrados, ocorrência de febre e alterações a nível de leucócitos, caracterizando sinais de infecção sistêmica, expectoração alterada e detecção do agente patogênico (KALANURIA et al., 2014).

No Brasil, os dados oriundos do SUS (Sistema Único de Saúde) mostraram que a segunda causa de hospitalização no ano de 2017 foi a pneumonia, sendo a mesma responsável por cerca de 14% de todas as hospitalizações que ocorreram (DATASUS, 2017). Somando a isso, a Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica (PAV) precoce normalmente é causada pelas bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e pela Gram-negativa *Haemophilus influenzae*. Enquanto isso, a PAV tardia é frequentemente causada pelas Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e pelas Gram-positivas *Enterobacter* spp. e *S. aureus* resistente à metilina (MRSA). Com isso, ela está associada à elevação de duas vezes o custo para o tratamento e 86% da taxa de mortalidade.

Diversas infecções são causadas por bactérias multirresistentes, constituindo um problema grave de saúde pública a nível mundial. Sendo assim, essas infecções interferem no aumento drástico da morbidade dos pacientes e seu prognóstico, bem como aumentam a mortalidade e os custos com saúde, oriundos principalmente do tempo de internação (EL ME-KES et al., 2019).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as infecções associadas aos cuidados de saúde (IACS), conhecidas também como infecções hospitalares ou nosocomiais, são definidas como infecções ocorridas enquanto o paciente está recebendo atenção médica, seja em hospital ou outra instituição hospitalar, e que, no momento em que foi admitido, não se faziam presentes ou estavam em processo de incubação. Além disso, inclui-se também as infecções que o paciente adquire no próprio estabelecimento de saúde, podendo manifestarem-se somente após sua alta, incluindo ainda infecções de cunho ocupacional e entre os funcionários, sendo a PAV

uma das infecções nosocomiais mais comuns (WHO, 2016; 2011; GUILLAMET, KOLLEF, 2015).

Como exemplos de bactérias que são comumente encontradas em pneumonias associadas à ventilação mecânica, temos: *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., entre outras (AMARAL et al., 2009; AMORIM BATISTA et. al., 2013). *A. baumannii* possui facilidade para sobreviver em condições extremas, adaptando-se facilmente ao ambiente hospitalar, enquanto *P. aeruginosa* tem sua importância clínica voltada à sua erradicação complicada e às frequentes falhas terapêuticas (SILVA, 2009; ALTERTHUM et al., 2014). Além disso, um estudo feito por Ferrer et. al. (2015), mostrou que muitos casos de pneumonia são causados por mais de um patógeno, o que muitas vezes a clínica não consegue perceber.

Muitas dessas bactérias pertencem ao chamado grupo ESKAPE, que reúne seis patógenos que costumam apresentar resistência a múltiplos antimicrobianos. São eles: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e, por fim, o gênero *Enterobacter* spp. Devido principalmente a essas bactérias, a OMS incluiu, no ano de 2016, os seis microrganismos ESKAPE em uma lista composta por doze bactérias, cuja resistência aos antimicrobianos requer com urgência que novos fármacos sejam pesquisados e lançados no mercado (TAcCONELLI et al., 2018).

Recentemente o nosso grupo de estudo pesquisou a frequência de genes de resistência em bactérias Gram-negativas, utilizando a técnica de PCR convencional, a fim de detectar principalmente β -Lactamases, a exemplo de *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{TEM}*, *bla_{AMPC}*, *bla_{KPC}* (*K. pneumoniae* carbapenemase) e *bla_{NDM}* (*New Delhi metallo-beta-lactamase*). O estudo mostrou que 89% das bactérias apresentaram positividade para pelo menos um dos genes citados, sendo este um dado preocupante, principalmente no que diz respeito ao tratamento. As bactérias *A. baumannii*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* foram as mais frequentes.

Aliado aos mecanismos de resistência aos antimicrobianos, a patogenicidade bacteriana atua como fator que torna o microrganismo apto a causar uma doença (GIRARDELLO, 2007; VIEIRA, 2009). A patogenicidade dos microrganismos muito se

deve pela sua expressão de genes codificadores de fatores de virulência, o que pode facilitar a colonização por parte do agente patogênico sobre o hospedeiro, alterando sua fisiologia e, assim, levando a uma doença. Importantes fatores de virulência são encontrados em diversos microrganismos, como adesinas, toxinas, invasinas, proteases, sistemas de captação de ferro, além de fatores que irão inviabilizar o sistema imunológico daquele hospedeiro (VIEIRA, 2009).

Muitos desses fatores de virulência estão envolvidos com a adesão bacteriana a células e componentes biológicos do hospedeiro, sendo a formação de biofilme um dos mais comuns, muitas vezes regulados a partir de *quórum sensing* (QS). Outros mecanismos que irão facilitar essa adesão são os lipopolissacarídeos (LPS) e os *pili* bacterianos. A soma destes fatores permite que a bactéria tenha vantagem em relação às defesas do hospedeiro, permitindo uma melhor ação patogênica da mesma (JOLY-GUILLOU, 2005; KÖHLER et al., 2010; STRATEVA, MITOV, 2011).

Sendo assim, neste trabalho foram pesquisados diversos genes de virulência em bactérias Gram-negativas isoladas de secreção traqueal de pacientes internados em UTIs de hospitais de São Luís.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS)

Atualmente o termo Infecção Relacionada à Assistência à Saúde (IRAS), ou apenas Infecção Hospitalar, serve para definir toda infecção que um paciente adquire após internação hospitalar, em um prazo de 48 a 72 horas, de modo que não esteja durante o período de incubação. Além destas, considera-se como IRAS também as infecções que o paciente adquire no ambiente hospitalar, cuja manifestação se dá após a alta. Também são consideradas todas as infecções de neonatos que nasceram no hospital, com exceção daquelas transmitidas pela via transplacentária (MANSANO et al., 2017).

As IRAS são um grave problema a nível público, uma vez que estas infecções geralmente estão associadas à presença de microrganismos que circulam no ambiente hospitalar, podendo acometer aqueles pacientes que estão em tratamento no hospital, unidades de pronto atendimento (UPAs) e postos de saúde (OLIVEIRA et al., 2009).

O impacto das IRAS sobre a letalidade hospitalar, tempo de internação do paciente, bem como os custos são altos. As IRAS têm relevância para a saúde pública considerando seu impacto ao induzir a internação de inúmeros pacientes graves e que estão imunocomprometidos. Assim, países ditos em desenvolvimento são os que mais sofrem com estas infecções, e em muitos casos o número é 20 vezes superior aos países desenvolvidos (PADOVEZE; FORTALEZA, 2014).

As formas de transmissão destas infecções são diversas: pode ser a partir do contato direto ou indireto com diferentes fluidos corpóreos, secreções, alimentos, superfícies e aerossóis. Deve-se levar em conta também que o déficit da qualificação profissional em comunhão com uma estrutura física deficiente, bem como o desconhecimento de medidas que controlem essas infecções vão ao encontro da disseminação das mesmas (PADOVEZE, 2014).

O elevado risco de mortalidade ligada às IRAS está estritamente associado a diversos fatores, como: realização de procedimentos invasivos, seja para fins diagnósticos ou terapêuticos, a gravidade da doença de base que vem acometendo o paciente, bem como o sítio da infecção, adequação da terapia daquele paciente e de

forma bem importante, a sensibilidade dos microrganismos aos principais antimicrobianos utilizados na antibioticoterapia (SOUZA et al., 2015).

No Brasil foi visto que as IRAS são responsáveis pela quarta maior causa de mortalidade nas Unidades de Terapia Intensiva (UTIs). Entretanto, nem sempre os dados que são disponibilizados têm clareza em sua divulgação e muitas vezes estão obsoletos. Soma a isso o fato de muitos hospitais não divulgarem suas informações, o que gera um déficit por não se conhecer a extensão real do problema que acomete de modo importante o país (ABEGG; SILVA, 2011).

2.2 Pneumonia

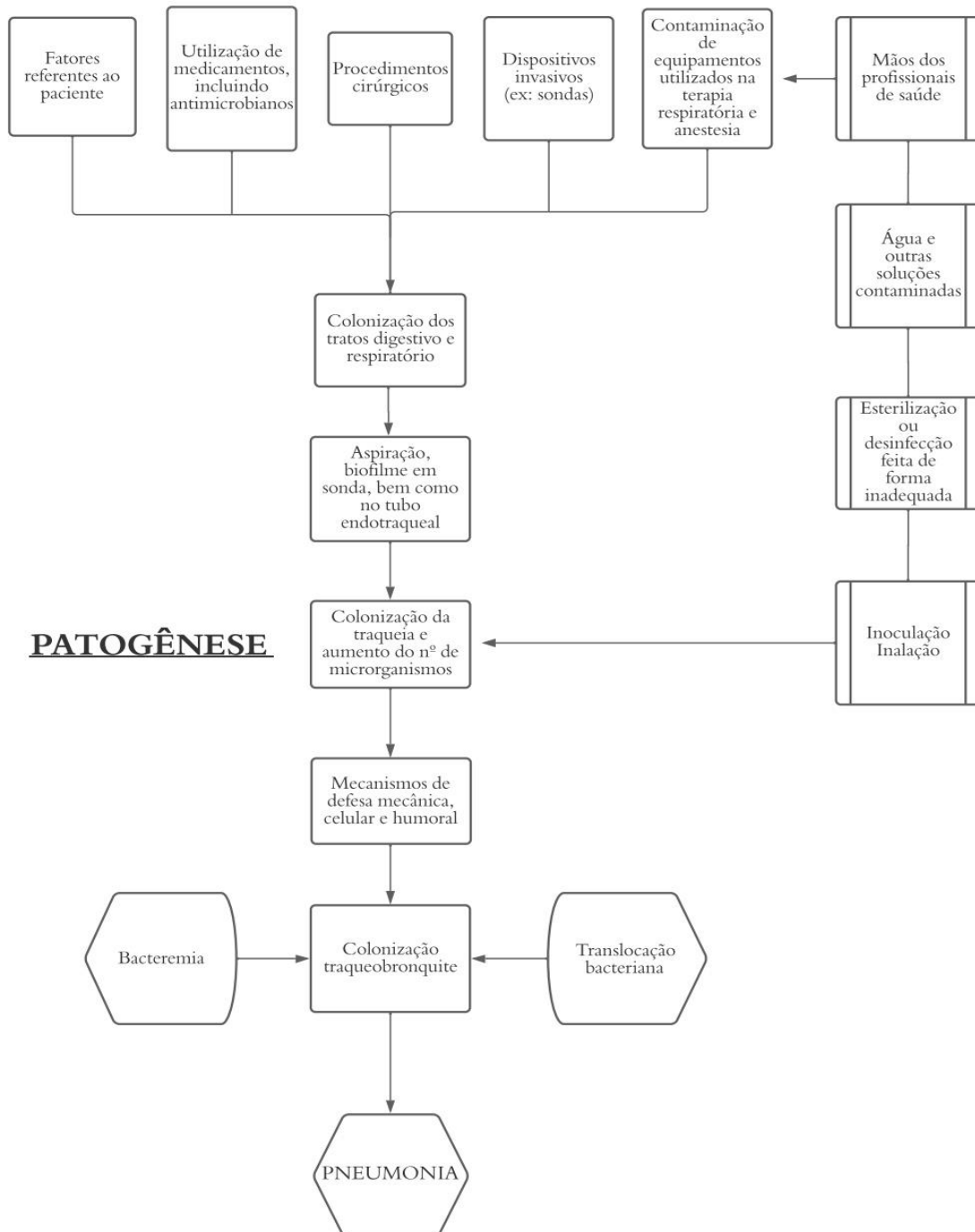
As doenças do trato respiratório em geral afetam adultos, crianças e idosos e, devido a isso, são causas bem importantes de adoecimentos e óbitos no mundo inteiro. A partir de dados da Organização Mundial de Saúde, doenças respiratórias como um todo correspondem a aproximadamente 14% do total de mortes ocorridas no mundo. Dentre essas doenças, aquelas relacionadas ao trato respiratório inferior têm variação de 31 mortes para cada 100 mil habitantes, no caso de países com renda elevada, e até 91 mortes para cada 100 mil habitantes, no caso de países de renda per capita mais baixa. No ano de 2012, com base em dados do *World Health Statistics*, as três causas mais importantes de danos potenciais de vidas perdidas no planeta foram: acidente vascular cerebral (AVC), as doenças cardíacas isquêmicas e as infecções do trato respiratório inferior, o que inclui a pneumonia (WHO, 2014).

Define-se a pneumonia como uma infecção que ocorre no parênquima pulmonar resultante da propagação de agentes patogênicos nos espaços alveolares e da resposta que o hospedeiro obtém à injúria provocada por estes agentes, sendo os principais as bactérias, vírus e os fungos (KASPER; FAUCI, 2015).

A pneumonia relacionada à assistência à saúde é uma das IRAS que ocorre com maior frequência, podendo ser considerada a principal dentre todas. A patogênese desta doença envolve uma forte interação entre patógeno e hospedeiro, bem como suas variáveis epidemiológicas. São diversos mecanismos que influenciam na ocorrência dessas infecções (Figura 1), sendo mutáveis de acordo com a

população ou o agente etiológico. É sabido, entretanto, que a origem tem relação, sobretudo, com a bronco-aspiração.

Figura 1: Mecanismo de patogênese da pneumonia relacionada à assistência à saúde, bem os possíveis alvos de prevenção



Fonte: CRAVEN, et al., 2007 (adaptado).

Mesmo em países considerados desenvolvidos, a pneumonia ainda é uma das maiores causas de mortalidade, apesar das técnicas de diagnóstico e tratamento terem avançado significativamente. As faixas etárias extremas, ou seja, crianças, principalmente abaixo dos 5 anos, e idosos maiores de 70 anos, têm a maior incidência da infecção (LEAL et al., 2012).

A gravidade das pneumonias e seu impacto social nas variadas populações são verificados diante dos indicadores de morbidade e mortalidade elevados. De acordo com os dados do Sistema de Informação sobre Mortalidade do Departamento de Tecnologia da Informação do Sistema Único de Saúde (SIM/DATASUS), no Brasil, no período que compreende os anos de 1996 a 2012, as pneumonias constituíam uma mediana de aproximadamente 37% de todos os óbitos por doenças do trato respiratório (SOCIEDADE DE PEDIATRIA DO RIO GRANDE DO SUL, 2014).

Além disso, ainda segundo o DATASUS, a pneumonia acomete aproximadamente 2,1 milhões de pessoas no Brasil, obtendo uma média de 960 mil casos a cada ano, sendo assim a causa principal de internação em hospitais e a 5ª maior causa de morte, uma vez que as estações do inverno interferem no aumento das hospitalizações e óbitos por pneumonias (BRASIL, 2014). O coeficiente de mortalidade por pneumonia, no ano de 1997, era de 18,8/100.000 habitantes, enquanto em 2013 o coeficiente elevou para 34,0/100.000 habitantes. Distribuindo-se os dados, houve 18% de óbitos por pneumonia em crianças abaixo de 5 anos de idade e 57% em idosos com idades acima dos 60 anos (SOCIEDADE DE PEDIATRIA DO RIO GRANDE DO SUL, 2014).

Para fins de diagnóstico da pneumonia não há um padrão-ouro, devendo ser feito um somatório de informações clínicas, radiológicas e microbiológicas. O material a ser coletado para o diagnóstico por ser por broncoscopia e lavado bronco-alveolar, que são técnicas invasivas, ou o aspirado traqueal, técnica não invasiva. Todavia, esta última é mais suscetível à contaminação, devendo considerar significativo o resultado quando superior ao do lavado bronco-alveolar, que corresponde a 10^4 UFC/mL, ou do escovado protegido (10^3 UFC/mL) (VILELA et. al., 2005; CANZI, COLACITE, 2016).

Até o momento atual, não há estudos que tenham conseguido identificar qual método de obtenção de amostra é superior: o aspirado traqueal tem como principal

vantagem ser menos invasivo e arriscado para os pacientes, enquanto o lavado bronco-alveolar é menos suscetível à contaminação, bem como permite a suspensão mais rápida da antibioticoterapia, quando seu resultado é negativo (KENAA, 2019).

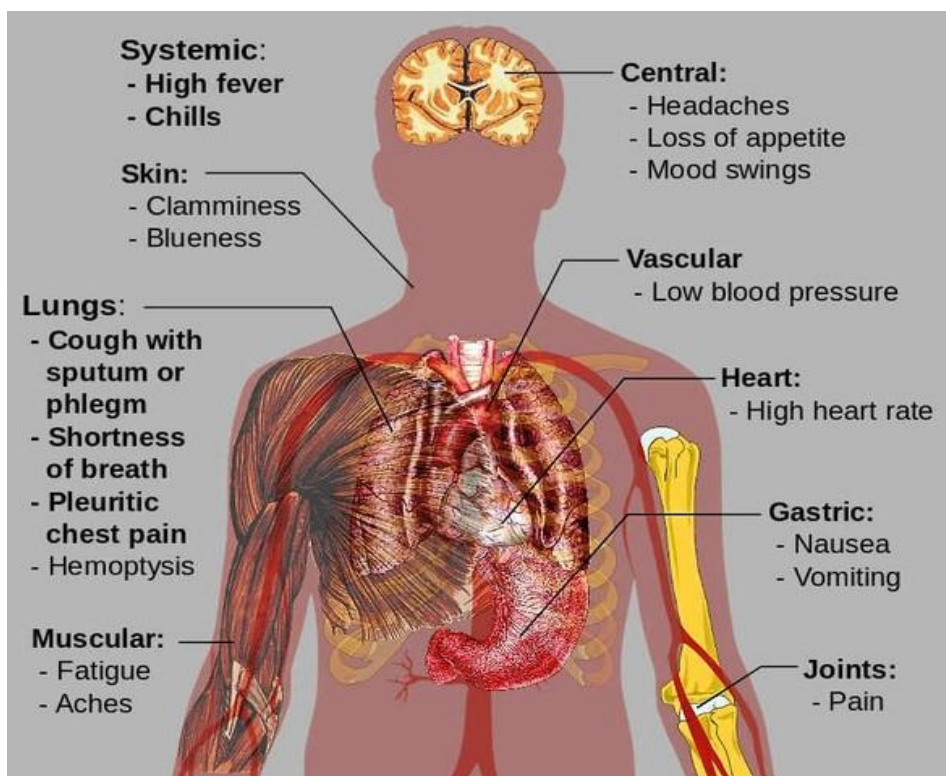
Há de se considerar que, independentemente do método como a mostra foi coletada, o transporte dela até o laboratório deve ser feito em no máximo duas horas, a fim de que seu processamento seja adequado (quando em temperatura ambiente deve ser imediato; caso seja armazenada 4°C, dentro de 24 horas). Caso estes cuidados sejam tomados, diminuem as chances de crescimento de microrganismos não patogênicos, permitindo a diferenciação entre colonização de outras bactérias e a infecção propriamente dita (KENAA, 2019).

A radiografia do tórax, associada com o exame físico mais a anamnese integra a tríade propedêutica clássica para pneumonia, sendo sua realização de rotina recomendada, caso este disponível, nas incidências pósterio-anterior e perfil. Contribui significativamente para o diagnóstico e permite também avaliar o tamanho das lesões, supostas complicações, bem como auxiliar no diagnóstico diferencial (BRITISH THORACIC SOCIETY BRONCHOSCOPY GUIDELINES COMMITTEE, 2001).

A ultrassonografia do tórax, ou UST, tem uma sensibilidade e acurácia maior, quando comparada à radiografia do tórax na identificação de alterações no parênquima pulmonar. Alguns achados a serem considerados são consolidações, padrão intersticial focal, anormalidades na linha pleural e lesões subpleurais. Chega a 100% a especificidade para consolidações, enquanto a radiografia do tórax se limita a 94% de sensibilidade, quando avalia este tipo de alteração (LIU et al., 2015).

A tomografia computadorizada do tórax é considerada o método mais sensível para identificar um acometimento infeccioso do parênquima pulmonar, apesar do seu custo elevado e exposição à radiação. É bem útil quando a radiografia e a ultrassonografia do tórax têm baixa acurácia, a exemplo de pacientes imunossuprimidos, obesos e indivíduos que tenham alterações radiológicas prévias (ROMANO et al., 2018; BANKER et al., 2007).

Figura 2: Os principais sintomas da pneumonia: destacam-se a febre alta e arrepios, a nível sistêmico e tosse seca ou produtiva dificuldade ao respirar, dores no peito, a nível de pulmões.



Fonte: EXPRESS; STAR, 2016.

Anteriormente à infecção acontece a colonização pelas bactérias, cuja elevada virulência permite que o parênquima pulmonar seja colonizado, mesmo que o indivíduo seja saudável. Em casos de indivíduos imunocomprometidos, basta à bactéria uma baixa ou média virulência para que haja colonização. As propriedades dos agentes infecciosos, infecções prévias por vírus do gênero *Influenza*, além de outras doenças que acometem o trato respiratório, com a doença pulmonar obstrutiva crônica irão propiciar à bactéria uma maior facilidade para se estabelecer nos pulmões (LAGE, 2013).

Quanto à pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV ou PAVM), esta corresponde a uma infecção pulmonar, cujo surgimento é após 48 horas da intubação traqueal em pacientes que são submetidos ao ventilador mecânico invasivo (SANTOS et al., 2013), havendo presença de infiltrado pulmonar, visto em radiografia do tórax,

com persistência por mais de 24 horas, não havendo explicação para outras supostas causas (NEPOMUCENO et al., 2014).

Os números de PAV variam geralmente de acordo com a população dos pacientes internados, bem como os métodos de diagnóstico que são disponibilizados. Entretanto, diversos estudos têm demonstrado que sua incidência aumenta com a duração da ventilação mecânica, apontando taxas de ataque de em torno de 3% por dia, durante o período de cinco dias de ventilação, número que cai para 2% nos dias subsequentes (ANVISA, 2017).

A presença do tubo endotraqueal é o fator de risco mais importante para PAV, visto que há prejuízo nos mecanismos de defesa naturais do indivíduo, bem como o reflexo da tosse e depuração mucociliar, por exemplo, além de permitir a comunicação de forma direta entre o espaço bucal supraglótica e do trato respiratório inferior. Somado a isso, interrompe-se a competência das barreiras anatômicas, que é também um mecanismo fisiopatológico importante na PAV, e que tem relação com a colonização de bactérias no tubo endotraqueal (COSTA, et. al; 2016).

Existem alguns fatores que também interferem no desenvolvimento da PAV, e os principais são a idade, a forma como o paciente foi admitido na UTI, ou seja, a gravidade de seu caso, alguma comorbidade preexistente, como doença pulmonar obstrutiva crônica, diabetes, insuficiência cardíaca e doenças neurológicas, bem como a ocorrência de alguma neoplasia, ou se o paciente tem histórico pós-operatório (CUI et al., 2018; WU et al., 2019).

Diversos estudos têm mostrado que a idade é uma condição de risco tida como independente quanto ao desenvolvimento da PAV, sendo abordada em estudos recentes como um fato de risco que não é modificável (CHANG; DONG; ZHOU, 2017; DING et al., 2017; WU et al., 2019).

Em pacientes que estão internados em UTI, a PAV é tida como a infecção mais frequente, com incidência que varia entre 10 e 30%. Além da mortalidade 8,1% a 31,9%, também está associada ao prolongamento da hospitalização do paciente e ao aumento dos custos com os cuidados de saúde que este irá receber. Entre as infecções nosocomiais é a segunda mais frequente, enquanto em unidade de terapia

intensiva é a mais comum (PEREZ-GRANDA, 2014). Com isso, a PAV representa um grande desafio terapêutico, no que diz respeito a nível hospitalar (CHICAYBAN, et al., 2017).

Outra questão a ser considerada é a sobreposição da PAV com outras doenças que acometem o trato respiratório inferior, podendo ser citada a traqueobronquite, em pacientes ventilados. Com isso, há uma dificuldade na identificação da PAV e sua real incidência. Outrossim, também existem variações na incidência de PAV que dependem por exemplo, de qual país, do tipo UTI, bem como os protocolos que cada hospital adota para a identificação desta condição clínica (PAPAZIAN; KLOMPAS; LUYT, 2020).

Antimicrobianos são um item de consumo elevado em hospitais, principalmente em unidades onde há pacientes mais graves, como as UTIs. No entanto, ao contrário de outros medicamentos, seu uso em excesso e de forma desnecessária causa, além de aumento no risco de reações adversas e excesso de custo, a redução da sua eficácia, muitas vezes pelo fato do microrganismo se adaptar por diferentes mecanismos de resistência (CANZI; COLACITE, 2016).

Os fármacos utilizados de forma incorreta não são limitados somente à prescrição médicos, uma vez que no mercado existem diversos produtos de ação antimicrobiana, como desinfetantes, o que favorece a seleção natural de bactérias resistente. Sendo assim, o conhecimento dos profissionais que atuam na área da saúde a respeito dos patógenos é o que pode tornar possível a minimização desses microrganismos resistentes (COSTA, 2017).

A resistência antimicrobiana funciona como um mecanismo de seleção natural, onde os microrganismos desenvolverem mecanismos de resistência. Uma população de microrganismos que é exposta a um determinado antimicrobiano faz com que aqueles que têm os mecanismos de resistência consigam sobreviver à sua ação. Enquanto isso, os que estão vulneráveis irão morrer (SOUZA, 2013).

Nos últimos anos, houve um aumento da resistência dos mais variados microrganismos aos antimicrobianos, o que confirma que os fármacos que hoje são utilizados na antibioticoterapia já estão perdendo a sua eficácia (METERSKY; KALIL, 2017).

2.3 Principais bactérias Gram-negativas relacionadas

2.3.1 *Pseudomonas aeruginosa*

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* foi isolada primeiramente no ano de 1882, por Gessard, a partir de secreção purulenta verde. Este microrganismo tem um estilo de vida considerado onipresente, sendo encontrado em diversos locais, como solo e água, e contribuindo com infecções em humanos, frequentemente. Na microbiota intestinal normal pode ser encontrada, porém não tem aderência eficaz ao epitélio normal intacto. Com isso, é um microrganismo que causa infecções apenas em pessoas imunossuprimidas, e não, saudáveis (ROY et al., 2014).

Pertencente à família Pseudomonadaceae, este microrganismo se apresenta como um bacilo Gram-negativo, aeróbio, não-esporulado, não fermentador de glicose e com mobilidade, devido à presença de flagelo polar. Entretanto, possui capacidade de sobreviver e multiplicar de forma lenta em ambientes anaeróbios, dadas algumas circunstâncias. *P. aeruginosa* é uma espécie que produz piocianina frequentemente, um pigmento de tom azul, enquanto a pioverdina possui um tom verde-brilhante, com fluorescência característica. Pode apresentar também, em alguns casos, pigmentos hidrossolúveis, como piorrubina (avermelhada) e piomelanina (amarronzada a preta) (FERREIRA; LALA, 2010; ARRUDA, 2013). Uma das características mais marcantes desta bactéria é o fato de acometer pacientes que estão em processo de imunossupressão (BOMFIM; KNOB, 2013).

Diversos estudos conferem um papel essencial da água com a colonização de *P. aeruginosa* em seres humanos, principalmente quando está em associação com bactérias que contêm múltiplos fatores de virulência. Isso porque a bactéria é frequentemente isolada em águas de superfícies, como rios e lagos, tendo predileção por águas residuais, devido a uma carga maior de nutrientes. Todavia, pode sobreviver em muitos casos em ambientes com quantidades reduzidas de nutrientes, como água mineral (ARRUDA, 2013; DOS SANTOS; COLOMBO, 2015; MAGALHÃES, 2013).

P. aeruginosa é uma bactéria que possui diversos mecanismos que irão viabilizar sua resistência a diversos antimicrobianos, incluindo beta-lactâmicos, aminoglicosídeos e quinolonas. Além disso, também apresenta com frequência

mutações a nível cromossomal, resultando em resistência adquirida. Comumente, essas mutações a tornam resistente inclusive a antimicrobianos mais recentes, como por exemplo, a combinação de ceftazidima-avibactam. Contribui também a transferência de genes de resistência, como as enzimas carbapenemases e outras ESBL, que têm sido identificadas com frequência e reduzem a suscetibilidade desses microrganismos a diversas classes de antimicrobianos (HORCAJADA et al., 2019).

P. aeruginosa resistente à classe dos carbapenêmicos foi listada pela OMS como uma das principais espécies bacterianas, as quais se têm necessidade urgente de desenvolver novos antimicrobianos para o tratamento de infecções, uma vez que os existentes no mercado já não têm a mesma eficácia contra estes microrganismos (TACONNELLI et al., 2017).

Ainda de acordo com a OMS, devido ao restrito número de medicamentos disponíveis para se tratar a infecção, a opção farmacoterapêutica de última linha passa a ser a classe de polimixinas, composta pelo polimixina B e polimixina E-colistina, sendo estes antimicrobianos lipodecapeptídicos cíclicos, com cinco grupos amino livres que lhes tornam altamente básicos (VAARA, 2019).

A bactéria é consideravelmente versátil no que diz respeito à sua capacidade de adquirir novos mecanismos de resistência, inviabilizando a antibioticoterapia na clínica (FEDERICO; FURTADO, 2018). No ano de 2011, Fujitani et al., mostraram que *P. aeruginosa* apresentou uma taxa de mortalidade de 87% por pneumonia associada à ventilação mecânica. Esta é uma bactéria normalmente multirresistente, e tem grande participação na falha terapêutica de uma variedade de antimicrobianos que são utilizados para o tratamento de diferentes infecções (SANTOS, et al., 2015).

2.3.2 *Acinetobacter baumannii*

A. baumannii são cocobacilos Gram-negativos aeróbicos, não fermentadores de glicose, imóveis, não exigentes, positivos para catalase e negativos para oxidase (LIN & LAN, 2014). Devido ao fato de pertencer a grupos de espécies intimamente ligadas, é difícil diferenciar a taxonomia de *Acinetobacter* a partir de características fenotípicas e métodos quimiotaxonômicos. Devido ao fato da suscetibilidade aos antimicrobianos e sua relevância na clínica serem significativamente distintos entre as espécies, faz-se necessário identificar as espécies exatas de *Acinetobacter*

(BERGOGNE-BEREZIN; TOWNER, 1996; DIJKSHOORN et al., 1996; HOUANG et al., 2003; LEE et al., 2007)

Acinetobacter spp. é um gênero que corresponde a um grande grupo de bactérias Gram-negativas, sendo 31 espécies distintas, com 17 ainda não nomeadas, por serem raramente isoladas em seres humanos (MARTINS; BARTH, 2013). Destas, *A. baumannii* é a espécie que possui maior relevância clínica, uma vez que este é um patógeno tido como oportunista e tem envolvimento em um extenso aspecto de infecções hospitalares, o que inclui meningite secundária, infecções do trato urinário (ITU), bacteremia, além de estar associada também à ventilação mecânica em pacientes internados em UTI, a exemplo da pneumonia (MARTINS, 2010; BARIN, 2013; SANTOS et al., 2019).

A. baumannii é um patógeno oportunista responsável por infecções nosocomiais, principalmente em pacientes que têm sua imunidade comprometida, bem como pacientes que estejam internados em UTIs. Uma característica importante deste microrganismo é sua capacidade de sobreviver e se proliferar pelos ambientes hospitalares, adquirindo resistência a diversas classes de antimicrobianos (HOWARD et al., 2012).

As infecções hospitalares em geral estão relacionadas ao *A. baumannii*, na qual são frequentemente descritas várias beta-lactamases, a exemplo de ESBL, Oxacilinases, AmpC, dentre outras (CASELLAS, 2011). Além disso, possui mecanismos como permeabilidade da membrana externa bastante reduzida, perda de porinas, modificação nos sítios de ligação dos antimicrobianos, bem como uma alta expressão de bombas de efluxo (GIAMARELLOU et al., 2008; PELEG et al., 2008).

Este microrganismo possui resistência a grande parte dos agentes antimicrobianos e, com isso, poucos são os fármacos que possuem eficácia em tratar suas infecções. Dentro de seu gênero é a espécie mais associada às infecções hospitalares, algo aliado aos seus mecanismos de resistência, que favorecem a sua colonização, seja no próprio ambiente do hospital, ou nos pacientes (LEE et al., 2017; VIEIRA; PICOLI, 2015). Em estudos com isolados clínicos provenientes de setores hospitalares, as cepas de *A. baumannii* têm apresentado elevadas taxas de resistência a inúmeros antimicrobianos, como as cefalosporinas, ciprofloxacina, gentamicina e também a sulfametoxazol/trimetoprima (UC-CACHÓN et al., 2019).

Os antimicrobianos da classe dos carbapenêmicos têm sido usados de forma bastante ampla em infecções causadas por *A. baumannii*. Entretanto, vêm surgindo cepas cada vez mais resistentes, que têm sido relatadas e frequentemente estão associadas a elevadas taxas de mortalidade, bem como um aumento dos custos de hospitalização (NEIDELL et al., 2012).

A soma destes fatores influencia na aparição de cepas multirresistentes, cuja dificuldade no tratamento é gerada e as opções terapêuticas são drasticamente reduzidas (ABDALHAMID et al., 2014).

2.3.3 *Klebsiella pneumoniae*

A bactéria foi descrita pela primeira vez no ano de 1882, pelo cientista Carl Friedlander, tendo sido identificada nos pulmões de pacientes acometidos por pneumonia (FRIEDLAENDER, 1882). *Klebsiella* spp., o gênero, consiste em bactérias Gram-negativas, sem motilidade, com formato de bastonete e vivem em diversos locais do ambiente, a exemplo de plantas, solo, animais e até mesmo em superfícies aquáticas. No entanto, também são comumente encontradas em dispositivos hospitalares, além de superfícies dos hospitais, como o chão e móveis (DAO et al., 2014; NAVON-VENEZIA; KONDRATYEVA; CARATTOLI, 2017; WYRES, HOLT, 2018).

No âmbito da saúde pública é um microrganismo que gera grande preocupação, uma vez que é responsável por inúmeras doenças, seja na comunidade ou no ambiente hospitalar. Além disso, é muito comum este microrganismo adquirir mecanismos de resistência aos antimicrobianos (EFFAH et al., 2020).

Essa resistência que estas bactérias têm mostrado se tornou um grande desafio para a comunidade médica, pois a capacidade delas em adquirir esses mecanismos de resistência é elevada e, devido a isso, as opções terapêuticas se veem reduzidas, prejudicando pacientes que necessitam de um tratamento (ANVISA, 2017).

Devido a esse avanço da resistência aos antimicrobianos, a prevenção é a principal forma de combate a infecções por *K. pneumoniae*. Com isso, para evitar problemas na antibioticoterapia, depende-se de boas práticas de assistência ao

paciente, havendo comunhão entre o paciente em si, os profissionais e o seu respectivo sistema de saúde (TAVARES, 2019).

Ademais, o isolamento de pacientes, quando se suspeita de contaminação, bem como a limpeza adequada do ambiente hospitalar também são medidas profiláticas. São formas de evitar que a bactéria se dissemine em UTIs, locais de pronto-atendimento, requerendo uma eficiente rede onde as informações têm de ser passadas à população e havendo uma elaboração de medidas para conter o avanço dessas possíveis contaminações (SHRIVASTANA; RAMASAMY, 2018)

2.3.4 *Escherichia coli*

Escherichia é um gênero de bactérias cujo nome foi dado devido ao pediatra alemão Theodor Escherich, e consiste em bacilos Gram-negativos, anaeróbicos facultativos que pertencem à família Enterobacteriaceae. Sua espécie mais conhecida é a *E. coli*, que tem uma ampla distribuição e é o mais importante microrganismo anaeróbio facultativo que habita o intestino de seres humanos e de outros animais que têm sangue quente. Sendo um bacilo possui formato de bastonete, e é capaz de fermentar a lactose, bem como produzir gás e ácido. Também é possível caracterizar esta espécie pelas suas cepas patogênicas, as quais são divididas em patótipos, devendo-se levar em conta a produção de alguns fatores de virulência e outros mecanismos que têm relação com a causa de diversas doenças (EWING, 1986; CONWAY, 1995; COURA et al., 2014; TORTORA et al., 2012).

Estas bactérias são capazes de secretar uma infinidade de proteínas que têm envolvimento em vários processos bacterianos, podendo citar a replicação de DNA, o transporte, a resistência a uma gama de antimicrobianos, a motilidade, eliminação de substâncias químicas, bem como a patogênese (NAVARRO-GARCIA et al., 2016).

Outras bactérias também têm relação com a infecção nosocomial. Comumente são microrganismos que não possuem uma grande exigência a nível nutricional, mas que possuem uma expressão bastante considerável de fatores de virulência, além de aeróbios e não esporulados. Devido a estas características, possuem condições para sobreviverem em situações bem extremas (ASSUNÇÃO et al., 2018).

2.4 Bactérias ESKAPE

Existe um grupo de bactérias que envolve tanto as Gram-positivas, quanto as Gram-negativas chamado ESKAPE, o qual se constitui pelas seguintes bactérias: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* e *Enterobacter* spp. Estas são as seis maiores responsáveis pelas infecções hospitalares, tendo taxas elevadas de resistência aos antimicrobianos. Devido a isso, todas essas bactérias possuem opções de tratamento bem reduzidas, o que preocupa a comunidade não apenas médica, mas também a científica (RICE, 2010).

Estas bactérias são listadas como prioridade crítica pela OMS, que sugere urgência na pesquisa de novos fármacos que possam tratar as infecções causadas por elas, uma vez que as opções que ainda restam muitas vezes não são capazes de lidar com suas cepas multirresistentes, podendo muitas vezes levar os pacientes a óbito (WHO, 2017). A resistência antimicrobiana dos patógenos que pertencem ao grupo ESKAPE, principalmente, não se associa somente ao alto risco de mortalidade, mas à elevação dos custos econômicos, uma vez que os pacientes necessitam ficar mais tempo internados e são necessários mais recursos, durante a sua estada (FOUNOU, FOUNOU, et al., 2017).

Os genomas dessas diversas bactérias foram estudados e a conclusão é que cerca de 20.000 genes de resistência são potencialmente críticos, dentre os relatados, e há escassez de antimicrobianos para tratá-los, especificamente. Nos EUA, apenas, nos últimos anos foram registradas mais de 99.000 mortes associadas a infecções no ambiente hospitalar. A pneumonia e a sepse são as duas maiores causas, sendo que em 2017 a pneumonia causou aproximadamente 55.000 mortes, elevando a carga, tanto microbiana, quanto econômica (ASLAM et al. 2018 ; DIXIT et al. 2019).

É demorado o processo para se encontrar novos fármacos para participarem da terapia antimicrobiana, principalmente pelas infecções causadas por algum patógeno ESKAPE. Uma patente dura 20 anos, sendo mais de 10 anos utilizados para a pesquisa do fármaco, e apenas depois de diversas fases é lançado no mercado. Devido a isso, torna-se importante utilizar medicamentos antimicrobianos em sinergismo. Produtos químicos que são sintéticos, bem como os peptídeos antimicrobianos (AMPs), nanomateriais e terapia de luz fotodinâmica são

recomendações alternativas para o tratamento dessas infecções (MULANI ET AL. 2019; MA ET AL. 2020).

2.5 Patogenicidade e fatores de virulência

A interação que ocorre entre os diversos microrganismos, sejam fungos bactérias ou vírus, com os seres humanos, desde sempre gerou bastante preocupação e é de difícil entendimento para todas as pessoas, devido a sua complexidade. Entretanto, recentemente, houve diversos avanços no âmbito médico, e a maior preocupação com os cuidados de saúde têm incentivado a amplificação dos conhecimentos acerca dos mecanismos de agressão e defesa que envolvem a instalação da doença. Com isso, pode-se estabelecer estratégias eficientes de controle e prevenção (MURRAY et al., 2014).

Pode-se destacar as bactérias, dentre todos os microrganismos, devido à sua função como microbiota residente no organismo humano, degradando produtos que seriam tóxicos, modulando o sistema imunológico, e protegendo contra microrganismos potencialmente patogênicos, ou, inclusive, produzindo substâncias que o hospedeiro irá utilizar (BARBOSA et al., 2010).

Entretanto, cabe aqui frisar que, mesmo que sejam bactérias da microbiota residente, estas podem se mostrar, em algumas situações de desequilíbrio, ou em introduções em sítios anatômicos estéreis ou inespecíficos, como patógenos importantes (MURRAY et al., 2014). A Literatura descreve uma grande quantidade de fatores de virulência, estes associados à patogenicidade microbiana, sendo assim um importante assunto na formação médica acadêmica (CORREA et al., 2017).

A patogênese bacteriana possui alguns estágios, que pode ser representada da seguinte forma: 1) a partir de uma fonte externa de transmissão, por meio de uma porta de entrada; 2) pela evasão das defesas primárias do seu hospedeiro, como a pele, por exemplo; 3) a partir da aderência às membranas mucosas, normalmente por *pili* bacterianos; 4) colonização devido à multiplicação da bactéria no local ao qual está aderida; 5) manifestações clínicas da doença, devido às toxinas produzidas ou invasão, acompanhada por um processo infeccioso; 6) resposta imune do hospedeiro,

inespecífica e específica durante os processos 3, 4 e 5; 7) progressão ou resolução da doença (LEVINSON, 2016).

Os fatores de virulência, que são elementos estruturais celulares e distintos, normalmente agem combinados, em diversos estágios da infecção, e isoladamente um fator é capaz de possuir funções bem diferentes e em diferentes estágios. Existem fatores de virulência com envolvimento em cada uma das etapas do processo de infecção (agregação, invasão, sobrevivência e dano) (SIQUEIRA E RÔÇAS, 2007).

Dentre os fatores, existem genes associados à virulência que se organizam dentro do cromossomo da bactéria, ou em elementos genéticos que possuem mobilidade, a exemplo de plasmídeos (KAYZER et al., 2005). Plasmídeos normalmente possuem genes associados à resistência aos antimicrobianos que, quando ligados à conjugação, manifestam um papel relevante na disseminação dessa resistência (CARATTOLI, 2013).

Praticamente todos os patógenos possuem algum mecanismo de adesão aos tecidos do hospedeiro, o que é chamado de aderência ou adesão, uma etapa estritamente necessária à patogenicidade. Essa aderência é realizada através de moléculas presentes na superfície do patógeno, denominadas adesinas ou ligantes, e se ligam especificamente a receptores de superfície complementares, encontrados em algumas células de tecidos do hospedeiro. Estas adesinas estão localizadas normalmente no glicocálice, e em outras estruturas presentes na superfície microbiana, como flagelo, fímbrias e *pili* (TORTORA et al., 2017).

As adesinas fimbriais são complexos proteicos que podem ser achados em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Podem ser chamadas de *pili* de ligação e são fibras relacionadas a uma variedade de funções, como ligação a superfícies bióticas e abióticas, transferência de material genético (DNA), formação de biofilme bacteriano, bem como motilidade celular (BERNE et al., 2015).

As toxinas são substâncias produzidas por esses microrganismos, capazes de provocar um dano ao hospedeiro, uma vez que podem alterar as vias de sinalização celular do mesmo e inibir a sua resposta imune nos estágios iniciais da infecção, além de posteriormente causar um colapso vascular (MOAYERI et al., 2015; PRESCOTT

et al., 2015; TORTORA et al., 2013). Basicamente existem dois tipos de toxina, as endotoxinas e as exotoxinas (PÉREZ, 2018).

Os lipopolissacarídeos, ou apenas LPS, são endotoxinas presentes nas bactérias e que compõem o folheto externo da membrana celular das Gram-negativas. É composto, de forma mais básica, por um antígeno definido “O”, na parte mais externa, oligossacarídeos mais para o centro e em seu núcleo a formação do lipídeo “A”, ancorando-o à membrana (VINOGRADOV, et al., 2002; CARVALHO, 2018).

As exotoxinas são a maior parte das toxinas. São proteínas solúveis e termolábeis, que parte das bactérias produzem. Podem ser secretadas no próprio meio ou liberadas a partir da lise dessas bactérias produtoras. Devido à natureza das exotoxinas, mesmo em baixas concentrações elas podem ser prejudiciais (TORTORA et al., 2013; PRESCOTT et al., 2009).

O biofilme é referido como uma colônia cuja composição se dá por várias espécies de microrganismos, e seu crescimento se dá em uma superfície, seja ela biótica ou abiótica. Alguns exemplos principais de superfícies são as próteses, as sondas e os cateteres, além de outros dispositivos utilizados amplamente na clínica hospitalar. Os biofilmes têm em sua composição um revestimento por cama heterogênea complexa, cuja matriz extracelular possui grande quantidade de proteínas, polissacarídeos e ácidos nucléicos, sendo que os próprios microrganismos lhes produzem (MENOITA et al., 2012; HENRIQUES, et al., 2013; SHIESARI JUNIOR, et al., 2015).

Existem genes de virulência coordenados por *quórum sensing* (QS), uma sinalização química, ajudando na produção de proteases, cuja função é contribuir para a aderência do microrganismo, levando à lesão do tecido. O QS também coordena a produção de exotoxinas (SABHARWAL et al., 2014; BADAMCHI et al., 201).

Estes e outros fatores de virulência irão contribuir para a patogenia bacteriano dentro do hospedeiro.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Detectar genes de virulência em bactérias Gram-negativas isoladas de amostras de secreções respiratórias de pacientes com pneumonia internados em UTIs de hospitais de São Luís.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar as bactérias mais frequentes em amostras de secreções respiratórias;
- Analisar o perfil de susceptibilidade das bactérias aos principais antimicrobianos utilizados na antibioticoterapia;
- Detectar os principais genes de virulência presentes nas bactérias a partir de técnicas moleculares.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

Em acordo com a Resolução nº 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde (CNS), esta pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade CEUMA, sob o parecer nº 766.690/2014.

4.2 Coleta das amostras

As amostras de secreção foram obtidas por conveniência pelo Laboratório Cedro e provenientes de pacientes diagnosticados com pneumonia, internados em UTIs de hospitais públicos e privados de São Luís – MA. As amostras de secreção traqueal foram coletadas de pacientes sob ventilação mecânica através de uma via aérea artificial e com auxílio de uma sonda de aspiração traqueal em um sistema a vácuo e acondicionados em bronco-coletores, no ano de 2017.

4.3 Identificação e teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

Foram utilizados os meios de cultura convencionais para semeadura dos espécimes clínicos, tais como, ágar sangue, ágar *MacConkey* e Caldo Tioglicolato, dentre outros.

Os microrganismos isolados foram identificados por meio de espectrometria de massa, por MALDI-TOF. Com o auxílio de uma agulha, pôs-se uma pequena quantidade de cada colônia crescida nos poços da placa de identificação da máquina, acrescida da matriz HCCA, conservante das colônias. Levou-se a placa para a máquina e, após alguns minutos, foi obtido o resultado da identificação microbiana. Nos casos em que o microrganismo não foi identificado, o procedimento foi repetido, fazendo um novo isolamento do microrganismo, caso necessário.

Após a identificação dos microrganismos em bactérias Gram-negativas, Gram-positivas ou fungos, foi realizado o antibiograma por método automatizado utilizando o Vitek2. Em uma capela de fluxo laminar, inoculou-se a bactéria ou fungo, com o auxílio de uma alça, em um tubo de ensaio com 3 mL solução salina (na escala de

turbidez 0,5 da escala de MacFarland). Em seguida, foram coletados 280 μL da solução para incubação no Vitek2. O equipamento possui placas com os antimicrobianos a serem testados, distintos para cada tipo de bactéria (Gram-negativas e Gram-positivas). O resultado é concluído em algumas horas e o profissional analisa quantos fármacos foram resistentes e sensíveis.

Em casos de resistência a uma grande parte dos antimicrobianos, foi realizado a confirmação pelo método de disco-difusão. Este último foi utilizado em casos de multirresistência, para fim de confirmação dos resultados, de acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2018). Para isto, foi realizado um inóculo bacteriano com turbidez 0,5 na escala de MacFarland e cultivado em meio MuellerHinton. Em seguida, foram aplicadas as fitas de E-test com os antimicrobianos apontados como resistentes pelo Vitek2. Este método consistiu em apontar a concentração inibidora, dada em mg/mL , enquanto transporta dois gradientes exponenciais antimicrobianos já predefinidos, onde um contém um inibidor a uma concentração constante. Feita a configuração, as fitas geraram uma concentração inibidora e detectaram a resistência baseadas na observação da inibição diferencial.

4.4 Técnicas de biologia molecular

As técnicas gerais de biologia molecular utilizadas neste estudo estão descritas em Sambrook *et al.* (1989) e Ausubel *et al.* (1995). O DNA bacteriano foi obtido pelo método de fervura. Para isto, uma colônia selecionada a partir de um cultivo prévio em ágar foi transferida para um tubo de polipropileno contendo 500 μl de água milliQ estéril e submetida à fervura por 10 min, seguido de resfriamento em banho de gelo por 5 minutos.

4.5 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

Para cada PCR foram utilizados: 1,0 μL de cada um dos iniciadores específicos (*foward* e *reverse*, 20 pM), 0,3 μL de *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA, 1 U/ μl), 1,0 μL de MgCl_2 (25 mM), 2,5 μl de tampão de PCR 1X (Invitrogen), 2,5 μL (0,2 mM) de dNTPs (Invitrogen), 1 μL de DNA e água MilliQ estéril para um volume

final de 25 µl. Os primers, ciclos de amplificação e os tamanhos dos amplicons para cada um dos genes pesquisados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Iniciadores utilizados no estudo com suas respectivas informações para amplificação dos genes, temperaturas de anelamento e amplicons.

Iniciadores	Sequência 5'-3'	Temp. °C	Amplicon pb	Referência
<i>oprI</i> F	ATGAACAACGTTCTGAAATTCTCTCTGCT	57	249	De Vos D, et al., 1998
<i>oprI</i> R	CTTGCGGCTGGCTTTTTCCAG			
<i>oprL</i> F	ATGGAAATGCTGAAATTCGGC	57	504	De Vos D, et al., 1998
<i>oprL</i> R	CTTCTCAGCTCGACGCGACG			
<i>pilB</i> F	TCGAACTGATGATCGTGG	54	408	Finnan et al, 2004
<i>pilB</i> R	CTTTCGGAGTGAACATCG			
<i>plcN</i> F	TCCGTTATCGCAACCAGCCCTACG	55	481	Paulyn et al., 2016
<i>plcN</i> R	TCGCTGTGCGAGCAGGTCGAAC			
<i>plcH</i> F	GCACGTGGTCATCCTGATGC	55	608	Wolska; Szweda, 2009
<i>plcH</i> R	TCCGTAGGCGTCGACGTAC			
<i>exoS</i> F	CTTGAAGGGACTCGACAAGG	54	504	Howard B. J., et al., 1987
<i>exoS</i> R	TTCAGGTCCGCGTAGTGAAT			
<i>exoU</i> F	GATTCCATCACAGGCTCG	55	3308	Finnan et al, 2004
<i>exoU</i> R	CTAGCAATGGCACTAATCG			
<i>phzI</i> F	CATCAGCTTAGCAATCCC	49	392	Finnan et al, 2004
<i>phzI</i> R	CGGAGAAACTTTCCCTC			
<i>phzM</i> F	ATGGAGAGCGGGATCGACAG	54	875	Finnan et al, 2004
<i>phzM</i> R	ATGCGGGTTTCCATCGGCAG			
<i>exoT</i> F	CAATCATCTCAGCAGAACCC	54	1159	Finnan et al, 2004
<i>exoT</i> R	TGTCGTAGAGGATCTCCTG			
<i>apr</i> F	TGTCCAGCAATTCTCTTGC	51	1017	Finnan et al, 2004
<i>apr</i> R	CGTTTTCCACGGTGACC			
<i>pilA</i> F	ACAGCATCCAAGTACGCG	59	1675	Finnan et al, 2004
<i>pilA</i> R	TTGACTTCTCCAGGCTG			
<i>toxA</i> F	GACAACGCCCTCAGCATCACCAGC	68	396	Winstanley C, et al., 2005
<i>toxA</i> R	CGCTGGCCCATTCGCTCCAGCGCT			
<i>lasA</i> F	GCAGCACAAAAGATCCC	47	1075	Finnan et al, 2004
<i>lasA</i> R	GAAATGCAGGTGCGGTC			
<i>lasB</i> F	GAATGAACGAAGCGTTCTCCGAC	55	284	Fazeli N.; Momtaz, H, 2014
<i>lasB</i> R	TGGCGTCGACGAACACCTCG			

Parte dos genes foram pesquisados separados, mas outros em reação multiplex, com as seguintes programações: 94°C por 4 minutos (desnaturação inicial); 30 ciclos de 94°C por 30 segundos (desnaturação), 55°C por 1 minuto (anelamento) e 72°C por 1 minuto e 30 segundos (extensão); 72°C por 5 minutos (extensão final); 4°C infinito (Hold), para os genes *toxA*, *lasB*, *plcH*, *plcN*; 94°C por 5 minutos; 30 ciclos

de 94°C por 30 segundos, 62°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto e 30 segundos; 72°C por 5 minutos; 4°C infinito para os genes *apr*, *phzI*, *phzM*, *pilA* e *pilB*; 94°C por 3 minutos; 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 53°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto; 72°C por 5 minutos; 4°C infinito para o gene *exoS*; 94°C por 3 minutos; 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto; 72°C por 5 minutos; 4°C infinito para o gene *lasA*; 95°C por 5 minutos; 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto; 72°C por 10 minutos; 4°C infinito para o gene *exoU*; 95°C por 5 minutos; 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 52°C por 1 minuto e 30 segundos e 72°C por 1 minuto e 30 segundos; 72°C por 10 minutos; 4°C infinito para o gene *exoT*.

4.6 Eletroforese em gel de agarose

Após PCR, os produtos da reação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (Invitrogen), utilizando tampão TBE 0,5X. A concentração do gel varia de 1% a 1,5%, de acordo com o peso molecular dos fragmentos. Ao gel foi adicionado 5 µL do corante *SYBR Safe DNA gel stain* (Invitrogen) para visualização dos fragmentos em luz ultravioleta. Como marcador de peso molecular foi utilizado o *1kb DNA Ladder* (Invitrogen). A corrida eletroforética foi realizada sob corrente constante de 80 V em tampão TBE 0,5X e ao término foi feita a visualização no transiluminador de luz ultravioleta e fotografada para arquivo.

5 RESULTADOS

No período de dois meses foram isoladas 135 bactérias a partir de amostras de secreção traqueal. As amostras foram oriundas de 129 pacientes internados em UTIs de hospitais públicos e privados de São Luís - MA. Destas, um total de 102 foram caracterizadas como bactérias Gram-negativas, distribuídas em 15 espécies.

A maior frequência de pacientes foi do sexo masculino (55%). Além disso, os pacientes foram distribuídos em faixas etárias, nas quais 12% possuíam idade igual ou inferior a 29 anos, 31% com idade entre 30 a 59 anos e 57% com idade igual ou superior a 60 anos.

Dentre as bactérias que foram isoladas, a mais frequente foi *A. baumannii*, com um total de 36 amostras, o que corresponde a 35,3%, seguido de *P. aeruginosa* com 30 amostras, correspondendo a 29,4%. Outras bactérias também foram encontradas em menor frequência, como *K. pneumoniae*, *Proteus* spp., *S. marcescens*, com 6 amostras cada (5,9%) e *E. coli*, com 4 amostras (3,9%) (Tabela 2).

Tabela 2: Frequência de bactérias Gram-negativas isoladas a partir de amostras de secreção traqueal de pacientes internados em UTIs de hospitais da rede pública e privada de São Luís, MA.

Bactéria	n	%
<i>Acinetobacter baumannii</i>	36	35,3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30	29,4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	5,9
<i>Proteus</i> spp.	6	5,9
<i>Serratia marcescens</i>	6	5,9
<i>Escherichia coli</i>	4	3,9
Outros	14	13,7
Total	102	100

Levando em consideração a frequência dos isolados e considerando a importância clínica das bactérias ESKAPE, a pesquisa foi direcionada principalmente a três bactérias: *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e *K. pneumoniae*.

Houve uma maior sensibilidade dos isolados à amicacina, imipenem, meropenem e polimixina B. *A. baumannii* apresentou elevada resistência aos antimicrobianos ceftriaxone (97,2%), ciprofloxacina (94,4%), imipenem (88,9%), meropenem (88,9%), piperacilina/tazobactam (88,9%) e cefepime (83,3%), além de um dos isolados demonstrar resistência à polimixina B, antimicrobiano de escolha para o tratamento de bactérias multirresistentes (Tabela 3 e Figura 3).

P. aeruginosa apresentou maior resistência à associação piperacilina/tazobactam (56,7%) e à gentamicina (53,3%). *K. pneumoniae* apresentou resistência elevada à ampicilina (100,0%), cefepime (83,3%), ceftazidima (83,3%) e ceftriaxona (83,3%) (Tabela 3).

Tabela 3: Perfil de resistência aos antimicrobianos das bactérias Gram-negativas mais frequentes isoladas a partir de amostras de pacientes internados em UTIs de hospitais da rede pública e privada de São Luís, MA.

Antimicrobianos	<i>A. baumannii</i> (n=36)	<i>P. aeruginosa</i> (n=30)	<i>K. pneumoniae</i> (n=6)
Amicacina	61,1	26,7	0,0
Ampicilina	-	-	100,0
Cefepima	83,3	43,3	83,3
Ceftazidima	-	-	83,3
Ceftriaxona	97,2	-	83,3
Ciprofloxacina	94,4	46,7	66,7
Ertapenem	-	-	-
Gentamicina	58,3	53,3	33,3
Imipenem	88,9	43,3	16,7
Meropenem	88,9	33,3	16,7
Piperaciclina/Tazobactam	88,9	56,7	66,7
Polimixina B	11,1	0,0	0,0

Ao todo, foram pesquisados quinze genes de virulência entre as amostras, que estão descritos em sua frequência nominal, percentual e sua função enquanto gene de virulência na Tabela 4, a seguir:

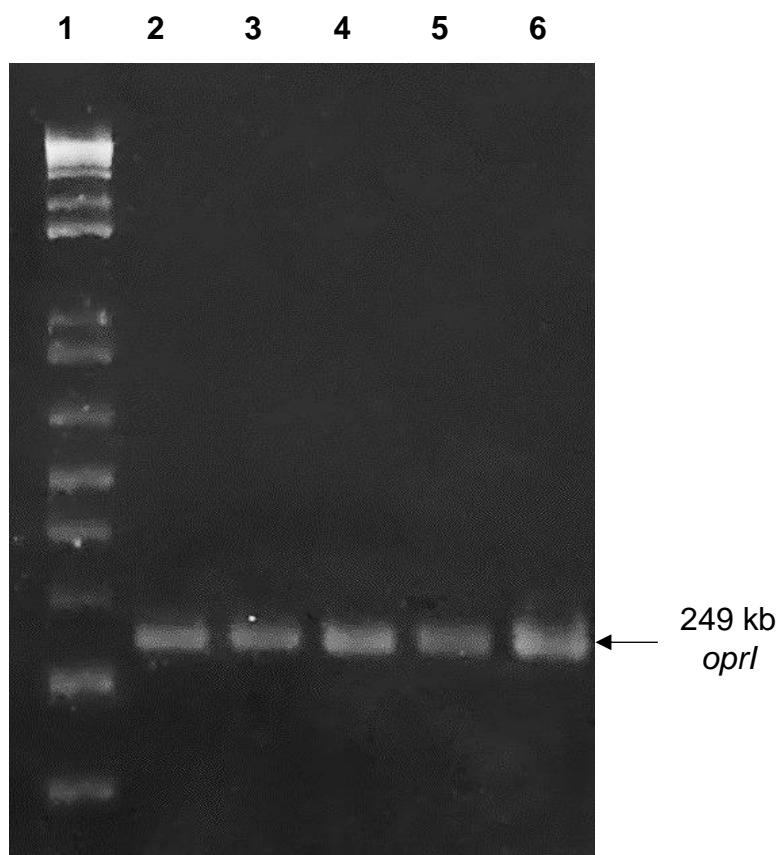
Tabela 4: Frequência dos genes de virulência que foram testados para a bactéria *P. aeruginosa*.

Gene	Função	n	%
<i>exoS</i>	Exoenzima	21	70,0
<i>oprI</i>	Lipoproteína	21	70,0
<i>phzI</i>	Operon Fenazina 1	6	20,0
<i>exoU</i>	Exoenzima	5	16,7
<i>toxA</i>	Exotoxina	4	13,3
<i>exoT</i>	Exoenzima	3	10,0
<i>phzM</i>	Enzima modificadora metil-transferase	3	10,0
<i>pilA</i>	Pili	1	3,3
<i>lasA</i>	elastase	1	3,3
<i>apr</i>	Fosfatase alcalina	0	0,0
<i>pilB</i>	Pili	0	0,0
<i>lasB</i>	Elastase	0	0,0
<i>plcH</i>	Fosfolipase	0	0,0
<i>plcN</i>	Fosfolipase	0	0,0
<i>oprL</i>	Lipoproteína	0	0,0

Os genes mais frequentes foram *exoS* e *oprI*, ambos com um total de 21 amostras positivas, o que equivale a 70,0% das amostras de *P. aeruginosa*; em seguida, o gene *phzI* com um total de 6 amostras positivas, o que corresponde a 20,0% das amostras; *exoU*, com 5 amostras positivas (16,7%); *toxA*, com 4 amostras positivas (13,3%); *exoT* e *phzM* com 3 amostras cada, correspondendo ambas a 10% do total; *pilA* e *lasA*, com 1 amostra positiva, cada (3,3%). Por outro lado, os genes *apr*, *pilB*, *lasB*, *plcH*, *plcN* e *oprL* não foram detectados em nenhuma amostra de *P. aeruginosa*.

Por serem genes predominantemente encontrados em *P. aeruginosa*, nenhum deles foi detectado em *K. pneumoniae*. Entretanto, o gene *oprI* foi encontrado em uma única amostra de *A. baumannii*, o que corresponde a 2,8% do total de amostras desta bactéria. Em contrapartida, os demais genes não foram detectados em nenhuma amostra. Foi feita uma nova PCR de todos os genes que não apresentaram ao menos uma amostra positiva, para fins de confirmação.

Figura 3: Eletroforese em gel de agarose (1,5%) dos fragmentos amplificados por PCR para o gene *oprI*.



O gel foi corado com *SYBR Safe* (Invitrogen) e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta. Canaletas: (1) marcador *1 kb plus DNA ladder* (Invitrogen); (2) 30L (controle positivo); (3) 22B, amostra de *A. baumannii*; (4) 86, amostra de *P. aeruginosa*; (5) 87, amostra de *P. aeruginosa*.

Dentro do mesmo estudo, também foi feita a identificação de genes de resistência, com duas variantes do gene *bla_{OXA}*. Este gene foi detectado em apenas duas amostras de *A. baumannii*, a variante *bla_{OXA-51}* esteve presente em todas as 36 amostras (37,89%) de *A. baumannii*, enquanto *bla_{OXA-23}* foi detectada em 15 amostras (15,79%). Entre os isolados de *P. aeruginosa* houve positividade para 6 amostras (6,31%), sendo 4 (4,21%) positivas para *bla_{OXA-51}*, 1 (1,05%) foi positiva para *bla_{OXA-23}* e uma foi positiva para as duas variantes concomitantemente.

Considerando os dados somente das bactérias positivas para *bla_{OXA}*, houve 100% de frequência para *bla_{OXA-51}* e 41,67% para *bla_{OXA-23}* entre os isolados de *A. baumannii*. Em relação a *P. aeruginosa* houve 20% de positividade, sendo 13,33% somente para *bla_{OXA-51}* e 3,33% somente para *bla_{OXA-23}* e para ambas as variantes concomitantemente.

6 DISCUSSÃO

Como visto, neste estudo, a maior parte dos pacientes acometidos foi do sexo masculino, com 55% do total, e 45% do sexo feminino, sendo um valor próximo ao do estudo de Mota et al. (2017) e Farias et al. (2019). Quanto à idade, este estudo mostrou que 57% dos pacientes internados possuíam idade acima de 60 anos, divergindo do estudo de Mota et al., uma vez que demonstrou que 46,3% dos pacientes internados possuíam idade acima de 60 anos. Entretanto, o estudo de Farias et al. (2019) demonstrou resultados mais próximos, com um total de 70%.

Neste estudo foi visto uma elevada frequência de bactérias Gram-negativas, sendo *A. baumannii* (40%) e *P. aeruginosa* (33%) as duas que respondem por mais da metade dos microrganismos isolados. Estas bactérias são comumente multirresistentes e responsáveis por causar pneumonia em pacientes internados em UTIs. Diversos fatores, como a interação patógeno-hospedeiro, bem como as variáveis a nível epidemiológico facilitam a patogênese da pneumonia, principalmente a relacionada à assistência à saúde (ANVISA, 2017).

O fato de haver bactérias MDR (*Multidrug resistant*), ou seja, resistentes a três classes ou mais de antimicrobianos, faz com que haja uma maior taxa de mortalidade dos pacientes, bem como restrição no número de antimicrobianos a serem utilizados na antibioticoterapia. Adicionado a esta problemática, tem-se visto que, nos últimos anos, uma quantidade limitada de novas drogas são incluídas no mercado (SILVA; MARTINS, FAVALEÇA, 2019).

Em muitos casos com uma prevalência acima de 80% de resistência a múltiplas drogas, *A. baumannii* tem se tornado uma considerável ameaça à saúde pública. Neste estudo, *A. baumannii* apresentou altas taxas de resistência aos antimicrobianos ceftriaxone (97,2%), ciprofloxacina (94,4%), imipenem (88,9%), meropenem (88,9%), piperacilina/tazobactam (88,9%) e cefepime (83,3%), o que condiz com dados da literatura (CDDEP: THE CENTER FOR DISEASE DYNAMICS, ECONOMICS AND POLICY, 2016; ZILBERBEG et al., 2016).

A elevada incidência de isolados de *A. baumannii* resistentes aos antimicrobianos carbapenêmicos (como imipenem e meropenem, com valores

próximos de 90%) se deve principalmente ao seu uso extensivo no tratamento de bactérias MDR, o que corrobora com o estudo de Nowak et al. (2017).

A bactéria *P. aeruginosa* responde por 33% dos isolados dentro do grupo de Gram-negativas. Este foi o mesmo resultado encontrado no estudo feito no Nepal por Khanal et al. (2013), e um valor próximo ao estudo de Gupta et al. (2016), feito na Índia, que encontrou um total de 40% dos isolados para o respectivo microrganismo. Além destes dois, o estudo de Poulakou et al. (2018) encontrou uma frequência de 29,6%.

Outro estudo, feito por Mendonça et al. (2019), no Brasil, obteve resultados semelhantes em relação à frequência por *P. aeruginosa*, com um total de 40%. Em contrapartida, *A. baumannii* teve uma frequência de apenas 13,3%, um valor bem inferior ao encontrado neste estudo. O mesmo estudo mostrou resultados próximos em relação à bactéria *K. pneumoniae*, com frequência de 13,3%, o dobro do encontrado neste estudo (6,6%). Esse valor vai de encontro ao estudo de Khanal et al. (2013), que encontrou um total de 25%.

Além de frequentes, estes microrganismos que foram isolados mostraram elevada resistência à maioria dos antimicrobianos aos quais foram submetidos os testes. Estes microrganismos comumente possuem mecanismos de resistência bacteriana a inúmeros antimicrobianos, e podem ser adquiridos por meio de mutações, transmissão de material genético ou até mesmo serem intrínsecos a estes microrganismos. Resistência intrínseca pode ocorrer sem que haja uma prévia exposição do microrganismo ao antimicrobiano, enquanto a adquirida pode ocorrer por mecanismos de alteração da permeabilidade da membrana, bomba de efluxo, alteração do local de ação, dentre outros (RICE; BONOMO, 2005; MUNITA; ARIAS, 2016).

A bactéria *A. baumannii* demonstrou resultados preocupantes quanto à resistência ao antimicrobiano polimixina B, uma vez que este medicamento é utilizado como uma das últimas opções para tratar infecções por Gram-negativas com elevada taxa de resistência aos carbapenêmicos (VARDAKAS; FALAGAS, 2017).

A elevada resistência à polimixina B foi observada em estudos realizados por Martins et al. (2014) e Genteluci et al. (2016). Tendo em vista seus resultados é

possível avaliar o risco cada vez maior para o tratamento de infecções por bactérias que, ao longo dos anos, têm desenvolvido mais a multirresistência aos antimicrobianos.

A ANVISA, em sua Nota Técnica 01/2013, informa que a terapia empírica mais apropriada para infecções causadas por enterobactérias que sejam multirresistentes deve ser feita utilizando-se a polimixina B ou E – colistina – associando-as com outros antimicrobianos. Alguns exemplos são os da classe dos aminoglicosídeos, como a amicacina e a gentamicina, carbapenêmicos, a exemplo de doripenem e meropenem, e tigeciclina. Assim, é importante evitar a monoterapia, uma vez que eleva o risco de desenvolver a resistência (ANVISA, 2014).

Neste estudo foi visto que as bactérias mais frequentes são *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, que correspondem a mais da metade das bactérias identificadas. Além disso, é possível observar que estas bactérias apresentam um elevado percentual de resistência a antimicrobianos de segunda escolha, como os carbapenêmicos, o que dificulta a antibioticoterapia e, conseqüentemente, a recuperação do paciente e elevação dos custos do hospital.

Neste estudo, além da avaliação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, foi possível pesquisar diversos genes associados com a virulência entre os isolados de *P. aeruginosa*. Dentre estes, os genes *exoT* e *exoS*, que codificam para a produção das proteínas ExoS e ExoT, respectivamente, que compartilham em torno de 76% de seus aminoácidos, sendo ExoS uma toxina bifuncional, com atividade de proteína ativadora de GTPase (GAP) e atividade de adenosina difosfato de ribosil transferase (ADPRT), atuando nas interações com as células hospedeiras, enquanto ExoT está fortemente ligada a ExoS, atuando na atividade de GAP (HAUSER, 2009).

Neste estudo, 16,7% das amostras foram positivas para *exoU* e 10% para *exoT*, do total de amostras. Estes valores divergem dos que foram encontrados pelo estudo de Valderrama (2020) e Alonso (2020), em que seus dados mostraram 57,9% e 31,11% de amostras positivas para *exoS*, respectivamente, e 28,9% e 100% para *exoT*, respectivamente. Enquanto isso, o estudo de Solano (2017) mostrou resultados mais próximos para *exoT*, com 16,1% das amostras pesquisadas sendo positivas. O

gene *exoU*, dentre as exotoxinas, foi o mais frequente, tendo sido encontrado em 70,0% das amostras, um resultado próximo ao de Adeyemi et al. (2020), com 74,6%).

phzI e *phzII*, que são operons da fenazina, e os genes *phzH*, *phzM* e *phzS* são responsáveis por codificar proteínas que estão envolvidas na formação de compostos de Fenazina que *P. aeruginosa* secreta. A ação destes compostos consiste em aumentar o estresse oxidativo intracelular, bem como produzir superóxido e peróxido de hidrogênio. Assim, essas substâncias são capazes de inibir a atividade mitocondrial, a proliferação celular e estimulam a secreção de citocinas pelos neutrófilos e macrófagos (BRADBURY ET AL., 2010; MITOV ET AL., 2010; BLANKENFELDT E PARSONS, 2014).

Neste estudo, *phzI* foi frequente em 20,0% das amostras, corroborando o estudo de Solano (2017). Em contrapartida, o mesmo estudo apresentou divergência quanto à frequência de *phzM*, com 32,3% contra 10,0% neste estudo. Os dois genes apresentam divergências em comparação com o estudo de Dehbashi (2020), que encontrou *phzI* em 28,8% e *phzM* em 31,5% de suas amostras.

Codificada pelo gene *toxA*, a exotoxina A é um fator de virulência extremamente tóxico secretada por *P. aeruginosa*, sendo até mesmo considerado o mais tóxico entre todos, devido ao seu processo de inibição da biossíntese de proteínas. Possui atividade necrotizantes em diversos tecidos, contribuindo assim, para a colonização da bactéria no organismo (MICHALSKA; WOLF, 2015). Neste estudo, *toxA* foi positivo em 13,3% das amostras, um percentual baixo, se comparado ao trabalho de Ullah (2017), que encontrou o gene em 33,3% de suas amostras. Há uma discrepância ainda maior quando comparado ao estudo de Ai Dawodeyah (2018), em que 80% de suas amostras foram positivas.

O processo de adesão bacteriana é uma etapa inicial e crítica para estabelecer a infecção, na qual envolve adesinas e receptores do hospedeiro. O pili é uma das adesinas essenciais para *P. aeruginosa* (BUCIOR; PIELAGE; ENGEL, 2012). Dois importantes genes envolvidos na adesão da bactéria em seu hospedeiro são *pilA* e *pilB*, alvos deste estudo, porém nenhuma das duas foi encontrada em grande frequência, estando *pilA* em apenas 3,3% das amostras, enquanto não houve amostras positivas para *pilB*.

Comparando-se os resultados com os encontrados por Buda et al. (2020), é possível constar uma certa divergência dos resultados para *pilA*, com frequência de 20,0% em seu trabalho. Por outro lado, *pilB* foi encontrado em apenas 2,0% das amostras, o que é algo bem próximo deste estudo. No estudo feito por Pobiega et al. (2018), *pilA* foi encontrada em 25,4% das amostras, aproximando-se dos resultados de Buda et al (2020). Porém, *pilB* teve apenas uma frequência de 3% no mesmo estudo. Com isso, logo se vê que *pilB* não é um gene encontrado frequentemente.

apr é um gene que codifica para uma protease alcalina que é responsável pela degradação de proteínas do sistema complemento do hospedeiro e a fibronectina. Por exemplo, a metaloprotease tem participação na hidrólise de diversas proteínas importantes, o que inclui diferentes citocinas e componentes do complemento (ANDREJKO et al., 2019). Neste estudo nenhuma amostra foi positiva para este gene, demonstrando grande divergência, quando comparado ao estudo de Nahar et al. (2017), que encontraram o gene em 55,6% do total de amostras, e ao estudo de Buda et al. (2017), onde 93% das amostras foram positivas para *apr*.

P. aeruginosa possui a elastase, uma enzima cuja codificação é feita por meio dos genes *lasA* e *lasB*. A elastase pode decompor desde citocinas a células de defesa, desempenhando também papel na decomposição de tecidos dos pulmões e vasos de elastina (ISLAMIEH; AFSHAR; ESMAELLI, 2019). Alonso et al. (2020), em seu trabalho, encontrou 100% de positividade para *lasB*, enquanto neste trabalho, entre as amostras testadas, não houve positivas. Quanto a *lasA*, um estudo publicado por Park e Koo (2022) mostrou 39% de amostras positivas, contra 3,3% deste estudo, sendo uma diferença também considerável. Os resultados deste estudo também diferem de Silva et al. (2021), que encontrou 63,0% de amostras positivas para *lasA* e 100% para *lasB*.

As lipoproteínas são importantes na interação da bactéria com o ambiente, podendo ter ação inerente também na resistência a antimicrobianos. Podem ser responsáveis inclusive nos sistemas de transporte de efluxo, o que afeta a permeabilidade celular (NIKAIDO, 1994). Neste estudo são representadas por *oprI* e *oprL*. O gene *oprI* fora encontrado exatamente em 70,0% dos isolados, corroborando os estudos de Adeyemi et al. (2020), que o encontrou em 74,6% de seus isolados e de Al-Dahmoshi, em 2018 (84,6%). O gene *oprL*, neste estudo, não apresentou

nenhuma amostra positiva, o que diverge do resultado de Chand et al. (2021), que encontrou em 100% das amostras e Al-Dahmoshi, que encontrou em 42,3% do total. Pode-se ver que o gene *oprL* apresenta resultados variados da literatura, podendo ser muito ou pouco frequente.

As fosfolipases do tipo C têm sua importância na fisiologia das células eucarióticas, uma vez que são capazes de controlar diversos processos fisiológicos e sendo substratos na síntese de moléculas importantes na sinalização, resultando em uma resposta celular. Neste estudo, foram pesquisados os genes *plcH* e *plcN*, porém ambos não foram detectados nas amostras pesquisadas. Diverge dos resultados encontrados por Naga et al. (2018), que encontrou ambos em 100% das amostras pesquisadas, em um n=50; diverge também do resultado de Bazghandi et al. (2021), que encontrou ambos em 86,9% de suas amostras; e de Monteiro et al. (2021), que encontrou *plcH* em 51,5% das amostras e *plcN* em 75,7% delas. Pode-se ver que nos três estudos de comparação, os genes foram encontrados em mais da metade do material pesquisado, um dado bem divergente do encontrado neste estudo.

P. aeruginosa é um dos seis patógenos que pertence ao grupo ESKAPE (LUPO; HAENNI; MADEC, 2018). Porém outros dois têm grande importância clínica, que são *A. baumannii* e *P. aeruginosa*. Uma análise de diversas publicações foi feita, a fim de encontrar pesquisas destas bactérias através de diversos destes genes, mas sem êxito para a maioria.

Foi feita a pesquisa com os mesmos quinze genes de virulência nas amostras de *A. baumannii* e *K. pneumoniae*. Ao todo, apenas em um isolado de *A. baumannii* foi encontrado o gene *oprI*. Importante ressaltar que não foi relatado, até o momento, outro estudo que tenha encontrado o mesmo gene de virulência para a bactéria em questão.

As oxacilinases, conhecidas apenas como OXA, são enzimas pertencentes à classe D de Ambler (AMBLER, 1980) e também ao grupo 2 de Bush (BUSH e JACOB, 2010). São caracterizadas pela sua capacidade de hidrolisar os antimicrobianos oxacilina e cloxacilina, além de serem dificilmente inibidas por ácido clavulânico e EDTA (QUEENAN; BUSH, 2007). Neste estudo foram estudadas duas variantes do gene *bla_{OXA}* (23 e 51), dentre as 498 variantes alélicas encontradas até fevereiro de 2015 (<http://www.lahey.org/studies/other.asp#table1>).

Em nosso estudo, a presença de bla_{OXA-51} foi detectada em todas as amostras de *A. baumannii*, corroborando com o trabalho de Coqueiro (2014) e Santos (2015). Já a presença de bla_{OXA-23} em amostras de *A. baumannii* foi inferior aos encontrados nos estudos de Vasconcelos et. al. (2015), que encontraram um total de 87,3% e Cortivo et. al. (2015), que detectaram em 69,6% das amostras. A presença de bla_{OXA-23} e bla_{OXA-51} em amostras de *P. aeruginosa* não foi detectada em níveis elevados neste trabalho, bem como nos trabalhos de Dias (2015) e Royer (2015), o que sugere que a multirresistência aos antimicrobianos pode estar associada a outros fatores de resistência.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Existe uma grande quantidade de bactérias que habitam o ambiente hospitalar e são responsáveis por diversas doenças em pacientes hospitalizados, como a pneumonia. Além disso, as unidades hospitalares são suscetíveis ao surgimento de diversas cepas de bactérias com resistência a vários antimicrobianos ou multirresistentes, uma vez que seu uso é feito em grande quantidade nesse local. Este estudo mostrou a elevada frequência de inúmeras bactérias, em grande parte oportunistas, como *P. aeruginosa*, que habitam o ambiente hospitalar, causam infecções em seus pacientes e, como vista nas elevadas taxas de resistência aos antimicrobianos, interferem na antibioticoterapia e, devido a isso, elevam o tempo de permanência do paciente, os custos e muitas vezes levam a óbito. Ressalta-se também a presença de diferentes fatores de virulência, que propiciam às bactérias uma maior facilidade de infecção àqueles pacientes que muitas vezes já possuem comorbidades e são imunocomprometidos.

Este estudo evidencia a presença de diferentes genes com potencial para conferir a estes microrganismos fenótipos de resistência e virulência. Apesar de nem todos os genes que foram estudados terem sido identificados nas bactérias pesquisadas, não se pode ignorar o potencial daqueles que foram encontrados, uma vez que, mesmo em menor quantidade, ainda assim contribuem negativamente para a saúde do paciente.

Como pôde ser observado, um gene (*oprI*), até então detectado em *P. aeruginosa*, foi encontrado em uma bactéria do mesmo grupo ESKAPE, *A. baumannii*, demonstrando o potencial cada vez maior das bactérias em transmitir seus genes para outras espécies. Pesquisadores e profissionais da área da saúde não podem ignorar a capacidade das bactérias em se tornarem mais resistentes e virulentas.

Diante disto, é preciso uma atenção dos profissionais de saúde que trabalham em hospitais aos cuidados, em primeiro lugar, com a higienização das mãos, porta de entrada de diversos microrganismos; ao manejo dos pacientes, bem como a utilização de dispositivos invasivos, como sondas e ventiladores mecânicos; e principalmente ao bom uso dos antimicrobianos, evitando a prescrição inadequada destes medicamentos, interpretando corretamente os resultados dos perfis de resistência das

bactérias e descartando de forma adequada aqueles que estiverem fora do prazo de validade. Todas estas medidas podem minimizar os impactos na saúde dos pacientes de UTIs, já debilitados, e facilitando sua estada no hospital, bem como sua saída.

8 CONCLUSÃO

- *K. pneumoniae* e *A. baumannii* foram as Gram-negativas mais frequentes em isoladas dos pacientes com pneumonia internados em UTI;
- *A. baumannii* apresentou elevada resistência a carbapenêmicos, antimicrobianos de segunda escolha, e até mesmo com um isolado resistente à Polimixina B;
- A exoenzima *exoS* e a lipoproteína *oprI* foram genes de virulência mais frequentes entre os isolados de *P. aeruginosa*;
- O gene *oprI*, originalmente encontrado em *P. aeruginosa*, foi detectado em um isolado de *A. baumannii*. Possivelmente, uma transferência horizontal de genes entre bactérias de espécies diferentes;
- *bla_{OXA}*, gene de resistência que fora estudado em duas variantes (*bla_{OXA-23}* e *bla_{OXA51}*) se mostrou mais frequente em *A. baumannii*, porém sua incidência em *P. aeruginosa*, mesmo menor, não pode ser ignorada;
- Tanto genes de virulência, quanto genes de resistência trazem consequências negativas ao paciente, uma vez que juntos são capazes de debilitá-lo e reduzindo suas chances de defesa. Além disso, os genes de resistência afetam a eficácia dos antimicrobianos e reduzem as opções terapêuticas.

REFERÊNCIAS

- ABEGG PTGM, SILVA LL. Controle de infecção hospitalar em unidade de terapia intensiva: estudo retrospectivo. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, 2011; Londrina, v. 32, n. 1, p. 47-58, jan./jun.
- ABDALHAMID B, HASSAN H, ITBAILEH A, SHORMAN M. Characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in a tertiary care hospital in Saudi Arabia: **New Microbiol**, 2014; v. 37, p. 65-73.
- ADEYEMI FAU, ADEBOYE RAU, ADEBUNMI AAU, YUSUF NAU, WAHAB APY. Detection of T3SS, oprI, aprA, and pvdA Genes in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* obtained from Wound Samples. **Adeyemi et al Pan African Journal of Life Sciences**, 2020; 4 (1): 17-24
- AI DAWODEYAH HY, OBEIDAT N, ABU-QATOUSEH LF, SHEHABI AA. Antimicrobial resistance and putative virulence genes of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with respiratory tract infection. **Germes**. 2018; 8(1):31-40. Published 2018 Mar 3. doi:10.18683/germes.2018.1130
- AL-DAHMOUSHI H. O. M, AL-KHAFAJI N. S, JEYAD A. A, SHAREEF H. K, AL-JEBORI R. F. Molecular Detection of Some Virulence Traits Among *Pseudomonas aeruginosa* Isolates, Hilla-Iraq. **Biomed Pharmacol J** 2018;11(2).
- ALONSO B, FERNÁNDEZ-BARAT L, DI DOMENICO EG, et al. Characterization of the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* strains causing ventilator-associated pneumonia. **BMC Infect Dis**, 2020; 20, 909. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05534-1>
- ALTERTHUM F, TRABULSI LR. Microbiologia. Atheneu, 6 ed. São Paulo, 2015
- MURRAY, PR; ROSENTHAL, KS; PFALLER, MA. Microbiologia médica. **Elsevier**, 2014; 7 ed. Rio de Janeiro.
- AMARAL SM, CORTÊS AQ, PIRES FR. Pneumonia nosocomial: importância do microambiente oral. **Jornal Brasileiro Pneumologia**. 2009; v. 35(11), p.1116-1124, Rio de Janeiro.
- AMBLER RP. The structure of β -lactamases. **Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.** 1980; 289: 321-31.
- AMORIM BATISTA OM, SAMPAIO GALLAS SANTOS M, DEUSDARÁ DE ALEXANDRIA FE, DE ARAÚJO MADEIRA MZ, RODRIGUES MOURA DA COSTA VALLE A, LOPES DE SOUSA, AF. Sensibilidade de germes relacionados à pneumonia associada à ventilação mecânica. **Revista de Pesquisa Cuidado é Fundamental Online [en linea]** 2013.

ANDREJKO M, SIEMIŃSKA–KUCZER A, JANCZAREK M, et al. *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease exhibits a high renaturation capability. **Acta Biochim Pol** 2019; 66:91–100.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Medidas de Prevenção de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. **Série Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde**. 2017; Brasília –DF.

ARRUDA, KLS. **Resistência das Pseudomonas à Ciprofloxacina e sua relação com a saúde ambiental**. [Monografia] 2013; Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina.

ASLAM B, WANG W, ARSHAD MI et al (2018) Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. **Infect Drug Resist** 11:1645–1658. <https://doi.org/10.2147/IDR.S173867>

ASSUNÇÃO RG, AMORIM WA, ABREU AG. Pneumonia bacteriana: aspectos epidemiológicos, fisiopatologia e avanços no diagnóstico. **Rev. Investig, Bioméd.** São Luís, 10(1): 83-92, 2.

BADAMCHI A, MASOUMI H, JAVADINIA S, ASGARIAN R, TABATABAEE A. Molecular detection of six virulence genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolates detected in children with urinary tract infection. **Microbial Pathogenesis**, 2017; n. 107, p. 44-47.

BANKER PD, JAIN VR, HARAMATI LB. Impact of chest CT on the clinical management of immunocompetent emergency department patients with chest radiographic findings of pneumonia. **Emerg Radiol**. 2007;14(6):383-8. <https://doi.org/10.1007/s10140-007-0659-0>

BARBOSA FHF, MARTINS FDS, BARBOSA LPJL, NICOLI JR. Microbiota indígena do trato gastrintestinal. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, 2010; 10(1):78-93.

BARIN J. **Avaliação de Heterorresistência e Resistência Adaptativa a Polimixina B em isolados de *Acinetobacter baumannii* Resistentes aos Carbapenêmicos**; Porto Alegre; 2013.

BARLETTA-FARÍAS R, PÉREZ-PONCE L, BARLETTA-DEL-CASTILLO J, GONZÁLEZ-GUIROLA M, SÁNCHEZ-CASTELLANOS R, PUJOL-PÉREZ M. Caracterización clínica y microbiológica de pacientes con neumonía asociada a la ventilación mecánica, Cienfuegos 2015-2017. **Medisur**. 2019 [citado 2020 Jun 18]; 17(4):[aprox. 10 p.]. Disponible en: <http://medisur.sld.cu/index.php/medisur/article/view/4131>

BERGOGNE-BEREZIN E, TOWNER KJ. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. **Clin. Microbiol Rev**. 1996; 9, 148–165.

BERNE C, DUCRET A, HARDY GG, BRUN VY. **Adhesins involved in attachment to abiotic surfaces by gram-negative bacteria** 2015;81:340–53.

doi:10.1111/j.1365- 2958.2011.07616.x.Mechanisms.

BLANKENFELDT W, PARSONS JF. The Structural Biology of Phenazine Biosynthesis. **Curr Opin Struct Biol.** 2014; 0:26-33. DOI: 10.1016/j.sbi.2014.08.013.

BOMFIM LB, KNOB A. Perfil Epidemiológico das Infecções Causadas por *Pseudomonas aeruginosa* em um Hospital Privado no Município de Guarapuava-PR. **Revista Saúde.** 2013; Com, Bahia, v. 9, n. 4, p. 264 - 274.

BRADBURY RS, RODDMAN LF, MERRITT A, REID DW, CHAMPION AC. Virulence gene Distribution in clinical, nosocomial and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Medical Microbiology.** 2010; 59, 881-890. DOI:10.1099/jmm0.018283-0.

BRASIL, Ministério da Saúde. Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde - DATASUS. **Índice de Pneumonia.** Brasília, 2014.

BRASIL. ANVISA. Plano Nacional para a Prevenção e o Controle da Resistência Microbiana. Serviços de Saúde. 15 maio 2017. Disponível em: <https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/item/plano-nacional-para-a-prevencao-e-o-controle-da-resistencia-microbiana-nos-servicos-de-saude>. Acesso em: 14 fev 2022.

BRITISH THORACIC SOCIETY BRONCHOSCOPY GUIDELINES COMMITTEE, A SUBCOMMITTEE OF STANDARDS OF CARE COMMITTEE OF BRITISH THORACIC SOCIETY. **British Thoracic Society guidelines on diagnostic flexible bronchoscopy.** Thorax. 2001; 56 Suppl 1:i1-21. https://doi.org/10.1136/thx.56.suppl_1.i1

BUDA A, JACHOWICZ E, TROJNAR S, PARASION S, KASPERSKI T, GELLER J, POBIEGA M. Antibiotic resistance and virulence characterization of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from respiratory tract infections. **Biophage Pharma S.A., ul. MED. DośW. MIKROBIOL.,** 2020; 72: 21-30

CANZI RK, COLACITE J. Frequência de pneumonia associada à ventilação mecânica com base em resultados de culturas quantitativas de secreções traqueais. **RBAC.** 2016; Abr; 48(18):118-22.

CARATTOLI A. Plasmids and the spread of resistance. **Int. J. Med. Microbiol.** 2013; 303: 298– 304.

CARATTOLI, A. et al. Novel plasmid-mediated colistin resistance mcr-4 gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. **Eurosurveillance,** 2017; v. 22, n. 31.

CARVALHO MML. **Caracterização do Papel da Proteína PLDkp na Virulência de *Klebsiella pneumoniae***. (Dissertação) Mestrado em Ciências – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Rio de Janeiro, 82f. 2018

CASELLAS JM. et al. Resistência a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la infectología. **Revista Panamericana de Salud Pública**, 2011; Washington v. 30, n. 6, p. 519-28.

CDDEP: The Center for Disease Dynamics, Economics and Policy. **Resistance Map: *Acinetobacter baumannii* Overview**. 2016. http://www.cddep.org/projects/resistance_map/acinetobacter_baumannii_overview.

CHAND Y, KHADKA S, SAPKOTA S, et al. Clinical Specimens are the Pool of Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* Harboring oprL and toxA Virulence Genes: Findings from a Tertiary Hospital of Nepal. **Emerg Med Int**. 2021; 2021:4120697. Published 2021 Oct 29. doi:10.1155/2021/4120697

CHANG L, DONG Y, ZHOU P. Investigation on Risk Factors of Ventilator-Associated Pneumonia in Acute Cerebral Hemorrhage Patients in Intensive Care Unit. **Can Respir J**, 2017; p. 7272080.

CHICAYBAN LM, TERRA ELVS, RIBELA JS, BARBOSA PF. Bundles de prevenção de pneumonia associada à ventilação mecânica: a importância da multidisciplinaridade. **Perspectivas Online: Biológicas e Saúde**, 2017, v.7, n.25, p.25- 35.

COQUEIRO MMM. **Identificação e diferenciação molecular pela análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA-PCR) das espécies de *Acinetobacter* isoladas de pacientes de hospitais de São Luis-MA**. 2014. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) - Universidade Ceuma.

CORREA MEG, et al. Mecanismo de agressão e defesa e sua correlação com a comissão de controle de infecção hospitalar. **Revista Científica Fagoc Saúde - Volume II – 2017**.

CORTIVO GD, GUTBERLET AF, FERREIRA JÁ, FERREIRA LE, DEGLANN RC, WESTPHAL GA, FRANÇA PHC. Antimicrobial resistance profiles and oxacillinase genes in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from hospitalized patients in Santa Catarina, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2015; 48(6):699-705.

COSTA JB, COSTA AL, TORRES F, SILVA AFG, TERRA JÚNIOR AT. Os principais fatores de risco da pneumonia associada à ventilação mecânica em uti adulta. **Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente**. 2016; 7(1): 80-92.

COSTA ALP, SILVA JUNIOR ACS. Resistência bacteriana aos antibióticos e saúde pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica (UNIFAP)**, 2017; 7, 45-57.

COURA FM. et al. Patotipos de *Escherichia coli* causadores de diarreia em bezerros: uma atualização. **Pesq. Vet. Bras**, 2014; v. 34, n. 9, p. 811–818.

EWING WH. **Edwards e Ewing's Identification of Enterobacteriaceae**. 1986; 4th ed. Nova York: Elsevier.

CRAVEN DE, CRAVEN KS, DUNCAN RA. **Hospital-acquired pneumonia**. In: Jarvis WR. Bennett & Brachman's Hospital Infections. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 5th edition, 2007, chapter 31:519.

CUI JB, CHEN QQ, LIU TT, LI SJ. Risk factors for early-onset ventilator-associated pneumonia in aneurysmal subarachnoid hemorrhage patients. **Braz J Med Biol Res**, 2018; v. 51, n. 7, p. e6830.

DAO TT. et al. *Klebsiella pneumoniae* oropharyngeal carriage in rural and urban Vietnam and the effect of alcohol consumption. **PLoS ONE**, 2014, v. 9, n. 3.

Departamento de Informática do SUS - DATASUS [homepage on the Internet]. Brasília: Ministério da Saúde [cited 2019 Apr 18]. **Morbidade Hospitalar do SUS - por local de residência - Brasil**. Available from: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/niuf.def>

DIAS VC. **Resistência aos carbapenêmicos e virulência de *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* isolados de um serviço de saúde terciário**. 2015. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2015. Universidade Federal de Juiz de Fora.

DING C, ZHANG Y, YANG Z, WANG J. et al. Incidence, temporal trend and factors associated with ventilator-associated pneumonia in mainland China: a systematic review and meta-analysis. **BMC Infect Dis**, 2017; v. 17, n. 1, p. 468.

DIJKSHOORN L, AUCKEN H, GERNER-SMIDT P, JANSSEN P, KAUFMANN ME, GARAZAR J, ET AL. Comparison of outbreak and nonoutbreak *Acinetobacter baumannii* strains by genotypic and phenotypic methods. **J. Clin. Microbiol.** 1996; 34, 1519–1525.

DIXIT A, KUMAR N, KUMAR S, TRIGUN V. Antimicrobial resistance: progress in the decade since emergence of New Delhi metallo- β -lactamase in India. **Indian J Community Med**. 2019; 44:4–8. https://doi.org/10.4103/ijcm.IJCM_217_18

DOS SANTOS G, COLOMBO TE. Prevalência de *Pseudomonas aeruginosa* em águas e superfície. **J Health Sci Instit**. 2015; 33(4):314-8.

DURRINGTON HJ, SUMMERS C. Recent changes in the management of community acquired pneumonia in adults. **BMJ**. 2008; 336(7658):1429-33.

EL MEKES AZK, AIT SAID L, OUAFI AT, BARAKATE M. The clinical and epidemiological risk factors of infections due to multi-drug resistant bacteria in an adult intensive care unit of University Hospital Center in Marrakesh-Morocco. **Journal of Infection and Public Health**. 2019; v.19, n.1, p.30292-8.

FEDERICO MP, FURTADO GH. Immediate and later impacts of antimicrobial consumption on carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella* spp. in a teaching hospital in Brazil: a 10-year trend study. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, 2018; 37(11), 2153-2158

FERRER M, MENENDEZ R, AMARO R, TORRES A. The impact of guidelines on the outcomes of community-acquired and ventilator-associated pneumonia. **Clin Chest Med**. 2011; 32, 491-505.

FERREIRA H, LALA ERP. *Pseudomonas aeruginosa*: Um alerta aos Profissionais de Saúde. **Revista Pan-americana Infectologia**, 2010; São Paulo, v.12, n. 2, p.44-50.

FINCK-BARBANÇON V, GORANSON J, ZHU L, SAWA T, WIENER-KRONISH JP, FLEISZIG SM, FRANK DW. ExoU expression by *Pseudomonas aeruginosa* correlates with acute cytotoxicity and epithelial injury. **Molecular microbiology**, 1997; 25(3), 547-557.

FOUNOU RC, FOUNOU LL, ESSACK SY. "Clinical and economic impact of antibiotic resistance in developing countries: A systematic review and meta-analysis.", **PloS one**, 2017; v. 12, n. 12, p. e0189621.

FUJITANI S. et al. Pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*. Part I: epidemiology, **Clinical Diagnosis, and Source**. 2011; Chest, v. 139, p. 909-919.

GENTELUCI GL, GOMES DBC, SOUZA MJ, CARVALHO KR, VILLAS-BÔAS MHS. Emergence of polymyxin B-resistant *Acinetobacter baumannii* in hospitals in Rio de Janeiro. **J. Bras. Patol. Med. Lab**. 2016; vol.52 no.2 Rio de Janeiro. <https://doi.org/10.5935/1676-2444.20160021>.

GIAMARELLOU H. et al., *Acinetobacter baumannii*: a universal threat to public health? **Int J Antimicrob Agents**, 2008; v. 32, p. 106-19.

GUILLAMET CV, KOLLEF MH. Ventilator-associated pneumonia in the ICU: where has it gone? **Curr Opin Pulm Med**. 2015;21:226-31.

GUPTA R, MALIK A, RIZVI M, AHMED, M. Presence of metallo-beta-lactamases (MBL), extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) & AmpC positive non-fermenting Gram-negative bacilli among Intensive Care Unit patients with special reference to molecular detection of blaCTX-M & blaAmpC genes. **Indian Journal of Medical Research**. 2016; 144(2): 271-275.

HAUSER AR. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. Nature reviews. **Microbiology**, 2009; 7, 654–665.

HENRIQUES A, VASCONCELOS C, CERCA N. **A importância dos biofilmes nas infecções nosocomiais- o estado da arte**. 2013; Artigo de Revisão, Arquivos de medicina, Porto, Portugal, v. 27, n. 1, p. 27-36.

HOUANG ET, CHU YW, CHU KY, NG KC, LEUNG CM, CHENG AF. Significance of genomic DNA group delineation in comparative studies of antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* spp. **Antimicrob. Agents Chemother.** 2003; 47, 1472–1475. doi: 10.1128/AAC.47.4.1472-1475.2003.

HORCAJADA JP, MONTERO M, OLIVER A, SORLÍ L, LUQUE S, GÓMEZ-ZORRILLA S, BENITO N, GRAU S. Epidemiology and Treatment of Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Infections. **Clin Microbiol Rev.** 2019;32(4):e00031-19. doi: 10.1128/CMR.00031-19. PMID: 31462403; PMCID: PMC6730496.

HOWARD A, O'DONOGHUE M, FEENEY A, SLEATOR RD. *Acinetobacter baumannii*: um patógeno oportunista emergente. **Virulência**. 2012; 3 (3): 243-50.

ISLAMIEH DI, AFSHAR D, ESMAEILI D. Effect of Satureja khuzistanica essential oil (SKEO) extract on expression of lasA and lasB genes in *Pseudomonas aeruginosa*. **Iran J Microbiol.** 2019;11(1):55-59.

KALANURIA AA, ZAI W, MIRSKI M. Ventilator-associated pneumonia in the ICU. **Crit Care.** 2014;18:208.

KASPER DL, FAUCI AS. **Doenças infecciosas de Harrison**. 2015; 2.ed. Porto Alegre: AMGH.

KAYSER FH, BIENZ KA, ECKERT J, ZINKERNAGEL RM. **Medical Microbiology**, 2005; (10^a ed). New York, NY: Thieme.

KENNA, BLAINE; RICHERT, MARY ELIZABETH; CLAEYS, KIMBERLY C.; SHIPPER, ANDREA; SULLIVAN, KAEDE V.; SCHRANK, GREGORY M.; O'HARA, LYNDSEY M.; MORGAN, DANIEL J.; SHANHOLTZ, CARL; LEEKHA. Surbhi. Ventilator-Associated Pneumonia: diagnostic test stewardship and relevance of culturing practices. Current Infectious Disease Reports, [S.L.], v. 21, n. 12, p. 1-10, 21 nov. 2019. **Springer Science and Business Media LLC**.
<http://dx.doi.org/10.1007/s11908-019-0708-3>.

KHANAL S, JOSHI DR, BHATTA DR, DEVKOTA U, POKHREL B. β -Lactamase-Producing Multidrug-Resistant Bacterial Pathogens from Tracheal Aspirates of Intensive Care Unit Patients at National Institute of Neurological and Allied Sciences, Nepal. **ISRN Microbiol.** 2013; v.2013: 847569.

KÖHLER, T. et al. Quorum sensing inhibition selects for virulence and cooperation in *Pseudomonas aeruginosa*. **PLoS Pathog.** 2010; V.6.

JOLY-GUILLLOU ML. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. **Clin Microbiol Infect Dis**, 2005; França, v.11, n.11, p.868-872.

LAGE J. Pneumonia. **Revista médica UNIFENAS**. 2013; Belo Horizonte, 4 jul 2013. Disponível em: < <http://unifenasresumida.blogspot.com.br/2013/07/pneumonia.html>>. Acesso em 19 de abril de 2019.

LAHEY. **OXA Type β -Lactamases**. Disponível em: <https://www.lahey.org/studies/other.asp#table1>. Acesso em: 12 de mar. 2021.

LEAL R, KISSMAN G, FRANCO CA. Pneumonias adquiridas na comunidade. **Jornal Brasileiro de medicina**. 2012; n.100, p. 7-14, Rio de Janeiro.

LEE JH, CHOI CH, KANG HY, LEE JY, KIM J, LEE YC, ET AL. Differences in phenotypic and genotypic traits against antimicrobial agents between *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomic species 13TU. **J. Antimicrob. Chemother.** 2007; 59, 633–639. doi: 10.1093/jac/dkm007.

LEE C, LEE JH, PARK M, PARK KS, BAE K, KIM YB, CHA C, JEONG BC, LEE SHI. Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. **Frontiers in Cellular And Infection Microbiology**, 2017; Lausanne, v. 7, 55.

LEVINSON W. **Microbiologia médica e Imunologia**. 2016; 13ª edição. São Paulo: AMGH Editora Ltda.

LIN MF, LAN CY. Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: from bench to bedside. **World J. Clin. Cases**. 2014; 2, 787–814. doi: 10.12998/wjcc.v2.i12.787

LIU X, LIAN R, TAO Y, GU C, ZHANG G. Lung ultrasonography: an effective way to diagnose community-acquired pneumonia. **EMERG MED J**. 2015;32(6):433-8. <https://doi.org/10.1136/emmermed-2013-203039>

LOOMBA PS, TANJEA J, MISHRA B. Methicillin and vancomycin resistant *S. aureus* in hospitalized patients. **J Glob Infect Dis** 2010;2:275-83.

LUPO A, HAENNI M, MADEC JY. Antimicrobial Resistance in *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas* spp. **Microbiology Spectrum**, 2018; 6(3).10.1128/microbiolspec.ARBA-0007-2017

MA Y, WANG C, LI Y et al. Considerations and caveats in combating ESKAPE pathogens against nosocomial infections. **Adv Sci**, 2020;7:1901872. <https://doi.org/10.1002/advs.201901872>

MAGALHÃES, MJTL. **Caracterização fenotípica e similaridade genética de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de efluentes hospitalares e água**

superficial do igarapé do Mindu/Manaus –AM. [Dissertação] Manaus: Universidade Federal do Amazonas, 2013.

MANSANO FPN. et al. Impacto de ação educativa na manutenção do decúbito elevado como medida preventiva de pneumonia associada à ventilação mecânica em Unidade de Terapia Intensiva. **ABCS Health Sciences**, 2017; v.42, n.1, p.21-26.

MARTINS AF, BARTH AL. *Acinetobacter* multirresistentes – um desafio para a saúde pública; **Scientia Medica**; Porto Alegre; 2013.

MARTINS HS, BOMFIM MRQ, FRANÇA RO, FARIAS LM, CARVALHO MAR, SERUFO JC, SANTOS SG. Resistance markers and genetic diversity in *Acinetobacter baumannii* strains recovered from nosocomial bloodstream infections. **International journal of environmental research and public health**. 2014; v. 11, n. 2, p. 1465-1478.

MATOSO LML, CASTRO CHA. Indissociabilidade Clínica e Epidemiológica da Pneumonia. CATUSSABA. **Revista Científica da Escola e Saúde**, 2013; Ano 2, nº 2.

MENDONÇA LM, RIBEIRO EV, SILVA JTN. Prevalência e perfil de sensibilidade dos microrganismos isolados em aspirado traqueal de pacientes com pneumonia associada à ventilação mecânica em unidade de terapia intensiva. **Revista Ciências em Saúde**, 2019; v9, n4.

MENOITA, E. et al. Biofilmes: conhecer a entidade. **Journal of aging and innovation**, 2012; Lisboa, v.1, n. 3, p. 23-32.

METERSKY ML, KALIL AC. New guidelines for nosocomial pneumonia. **Current Opinion In Pulmonary Medicine**, 2017; v. 23, n. 3, p.211-217.

MICHALSKA M, WOLF P. *Pseudomonas* exotoxin A: optimized by evolution for effective killing. **Front Microbiol**, 2015; 6, 963.

MITOV I, STRATEVA T, MARKOVA B. Prevalence of Virulence Gene Among Bulgarian Nosocomial and Cystic Fibrosis Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Brazilian Journal Of Microbiology**, 2010; 41:588-595. ISSN 1517- 8382.

MOTA EC, OLIVEIRA SP, SILVEIRA BRM, SILVA PLN, OLIVEIRA AC. Incidência da pneumonia associada à ventilação mecânica em unidade de terapia intensiva. **Medicina** (Ribeirão Preto, Online.) 2017;50(1):39-46.

MOAYERI M, LEPPLA SH, VRENTAS C, POMERANTSER AP, LIU S. Anthrax pathogenesis. **Annu Rev Microbiol.**, 2015;69: 185-208.

MULANI MS, KAMBLE EE, KUMKAR SN et al. Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: a review. **Front Microbiol**. 2019. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00539>.

MUNITA JM, ARIAS CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiology spectrum**,2016; v. 4, n. 2..

MURRAY PR. **Microbiologia Médica**. 2009; 6ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier.

MURRAY PR, ROSENTHAL KS, PFALLER MA. **Microbiologia médica**. 2014; 7.ed. Rio de Janeiro: Elsevier.

NAHAR N, et al. In silico Assessment of the Genotypic Distribution of Virulence and Antibiotic Resistance Genes in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, 2017; Vol. 7 (07), pp. 055-061.

NAVARRO-GARCIA F. et al. Secretion systems of pathogenic *Escherichia coli*. In: *Escherichia coli* in the Americas. **Springer**, 2016; p. 221-249.

NAVON-VENEZIA S, KONDRATYEVA K, CARATTOLI A. Klebsiella pneumoniae: A major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. **FEMS 75 Microbiology ReviewsOxford University Press**, 2017, may. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsre/article/41/3/252/3830265>. Acesso em: 13 mar 2022.

NEIDELL MJ, COHEN B, FURUYA Y, HILL J, JEON CY, GLIED S, et al. Custos de infecções associadas à saúde e à comunidade com organismos resistentes a antimicrobianos versus suscetíveis a antimicrobianos. **Clin Infect Dis**. 2012; 55 (6): 807-15

NEPOMUCENO RM, MIRANDA CB, NOGUEIRA C, SILVA LCF, SILVA LD. Fatores de Risco Modificáveis para Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica em Terapia intensiva; **Rev. de Epidemiologia e Controle de Infecção** 2014; 4(1).

NIKAIDO H. Prevention of drug access to bacterial targets: Permeability barriers and active efflux. **Sci**. 1994; 264:382-388

NITZ F, DE MELO BO, DA SILVA LCN, DE SOUZA MONTEIRO A, MARQUES SG, MONTEIRO-NETO V, DE JESUS GOMES TURRI R, JUNIOR ADS, CONCEIÇÃO PCR, MAGALHÃES HJC, et al. Molecular Detection of Drug-Resistance Genes of blaOXA-23-blaOXA-51 and mcr-1 in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Microorganisms** 2021; 9, 786. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040786>.

NOWAK J, ZANDER E, STEFANIK D, HIGGINS PG, ROCA I, VILA J, MCCONNELL MJ, CISNEROS JM, SEIFERT H, MAGICBULLET WORKING GROUP WP4, High incidence of pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates collected from patients with ventilator-associated pneumonia in Greece, Italy and Spain as part of the MagicBullet clinical trial, **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Volume 72, Issue 12, December 2017, Pages 3277–3282, <https://doi.org/10.1093/jac/dkx322>.

OLIVEIRA AC, DAMASCENO QS, RIBEIRO SMC. Infecções relacionadas à assistência em saúde: desafios para a prevenção e controle. **Revista Mineira de Enfermagem**, Belo Horizonte, 2009; v. 13, n.3, p. 445-450.

PADOVEZE MC, FORTALEZA CMCB. Infecções relacionadas à assistência à saúde: desafios para a saúde pública no Brasil. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, 2014;v. 48, n. 6, p. 995-1001.

PAPAZIAN L, KLOMPAS M, LUYT CE. Ventilator-associated pneumonia in adults: a narrative review. **Intensive Care Med**, 2020; v. 46, n. 5, p. 888-906.

PELEG AY, SEIFERT H, PATERSON DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen: **Clin Microbiol Rev**, 2008; v. 21, p. 538-82.

PARK Y, KOO SH. Epidemiology, Molecular Characteristics, and Virulence Factors of Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Patients with Urinary Tract Infections. **Infect Drug Resist**. 2022;15:141-151. Published 2022 Jan 14. doi:10.2147/IDR.S346313

PAULYN AT, UMEH E, NNA E. Detection of virulence genes in urinary *Pseudomonas aeruginosa* from pregnant women attending Antenatal clinic in Makurdi, Central Nigeria. **Sci. Res. J**. 2016, 4, 9.

PÉREZ-GRANDA MJ, BARRIO JM, MUÑOZ P, HORTAL J, RINCÓN C, BOUZA E. Impact of four sequential measures on the prevention of ventilator-associated pneumonia in cardiac surgery patients. **Critical Care**. 2014;18:R53.

PNEUMONIA: The disease that kills 80 every day. **Express And Star**, 2016. Disponível: <https://www.expressandstar.com/news/2016/01/06/pneumonia-the-disease-that-kills-80-every-day/>

PÉREZ CM. **Toxinas microbianas: aspectos generales y uso potencial como agentes antitumorales**. 2018. 33 f. Trabajo fin de Grado. Grado em Biología. Facultad de Ciencias – Universidad de La Laguna. La Laguna.

POBIEGA M, CHMIELARCZYK A, KOZIOL J, POMORSKA-WESOŁOWSKA M, ZIOLKOWSKI G, ROMANISZYN D, BULANDA M, WOJKOWSKA-MACH J. Virulence factors genes and drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains derived from different forms of community and healthcare associated infections. **Postepy Hig Med Dosw** (online), 2018; 72: 751-759 e-ISSN 1732-2693.

POULAKOU G, LAGOU S, KARAGEORGOPOULOS DE, DIMOPOULOS G. New treatments of multidrug-resistant Gram-negative ventilator-associated pneumonia. **Ann Transl Med**. 2018 Nov; 6(21): 423. doi: 10.21037/atm.2018.10.29.

PRESCOTT LM, HARLEY JP, KLEIN DA. **Microbiologia**. 2009; 7ª edición. Ed. Mc Graw Hill. Corea.

PRINCE A, WANG H, KITUR K, PARKER D. Humanized Mice Exhibit Increased Susceptibility to *Staphylococcus aureus* Pneumonia. **The Journal of Infectious Diseases**, 2017; Volume 215, Issue 9, Pages 1386–1395.

QUEENAN AM, K BUSH. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. **Clin Microbiol Rev** 2007; 20(3): 440-458.

REDDY CM, THATI V, SHIVANNAVAR CT, GADDAD SM. Vancomycin resistance among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates in Rayalaseema region Andhra Pradesh, South India. **World J Sci Tech** 2012;2:6-8.

RICE L, BONOMO R. Genetic and Biochemical mechanisms of bacterial. In LORIAN, V. (ed.). **Antibiotics in laboratory medicine**. 2005, 5. ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins.

RICE LB. Progress and challenges in implementing the research on ESKAPE pathogens. **Infection Control & Hospital Epidemiology**. 31, 2010. 7-10.

ROMANO L, PINTO A, MEROLA S, GAGLIARDI N, TORTORA G, SCAGLIONE M. Intensive-care unit lung infections: The role of imaging with special emphasis on multi-detector row computed tomography. **Eur J Radiol**. 2008;65(3):333-9. <https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2007.09.018>

ROY FC, SIMMONS S, DALE C, et al. The role of the healthcare environment in the spread of multidrug-resistant organisms: update on current best practices for containment. **Therapeut Adv Inf Dis**, 2 (2014), pp. 79-90

ROYER S, FARIA ALS, SEKI LM, CHAGAS TPG, CAMPOS PA, BATISTÃO DWF. et al. Spread of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* clones in patients with ventilator-associated pneumonia in an adult intensive care unit at a university hospital. **Braz J Infect Dis**. 2015 Aug; 19(4): 350-357.

SABHARWAL N, DHALL S, CHHIBBER S, HARJAI K. Molecular detection of virulence genes as markers in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from urinary tract infections. **International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics**, 2015; v. 5, n. 3, p. 125-134.

SANTOS ASE, NOGUEIRA LAA, MAIA ABF. Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica: Protocolo de Prevenção. **Rev. UNILUS Ensino e Pesquisa**. 2013; 10(20).

SANTOS FLSG. **Detecção de genes de resistência de *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes e caracterização clínica dos pacientes em hospital público de Sergipe**. 2015. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) – Universidade Federal de Sergipe.

SANTOS IAL, NOGUEIRA JMR, MENDONÇA FCR. Mecanismos de resistência antimicrobiana em *Pseudomonas aeruginosa*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, 2015; v. 47, n. ½, p. 5-12.

SANTOS CTC, AZEVEDO MMR, SILVA CB, ROCHA TJM, SANTOS AF, PIRES LLS. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de frutos verdes e maduros de *Schinus terebinthifolius* Raddi sobre isolados de *Acinetobacter baumannii*

multirresistentes. **Diversitas Journal**. Santana do Ipanema/AL. 2019; vol. 4, n. 1, p.285-291.

SATO H, FRANK DW, HILLARD CJ, FEIX JB, PANKHANIYA RR, MORIYAMA K, WIENER-KRONISH J. The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU. **The EMBO journal**, 2003; 22(12), 2959-2969.

SCHIESARI JUNIOR A. et al. Infecções por bactérias formadoras de biofilme: breve revisão. **Revista Brasileira de Medicina Interna**, 2015; v.2 n. 1 p. 37-47, Cantanduva -São Paulo.

SHARMA P, VISHWANATH G. Study of vancomycin susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples. **Ann Trop Med Public Health** 2012;5:178-80.

SHRIVASTAVA SR, SHRIVASTAVA PS, RAMASAMY J. World health organization releases global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. **JMS - Journal of Medical Society**, 2018; v. 32, n. 1, p. 76–77.

SILVA CRB, MARTINS FB, FAVALEÇA MF. The use of inhaled antibiotics for the treatment of mecanic ventilation associated pneumonia: an integrative review. **R. Funec Cient. Mult.**, 2019; v.8, n.10.

SILVA ST, LIMA JLC, RABELO MA, BEZERRA NETO AM, ALVES LR, PEREIRA JNP, LOPES ACS, MACIEL MAV. Phenotypic and genetic analysis of virulence factors in multidrug- sensitive and multidrug-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 11, p. e457101120032, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i11.20032. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/20032>. Acesso em: 14 feb. 2022.

SIQUEIRA JF JR, RÔÇAS IN. Bacterial pathogenesis and mediators in apical periodontitis. **Braz Dent J**. 2007;18(4):267-80

SILVA RNP. A Importância do *Acinetobacter baumannii* na infecção adquirida nos cuidados de saúde. **Universidade do Porto**, Junho 2009.

SOCIEDADE DE PEDIATRIA DO RIO GRANDE DO SUL [homepage on the Internet]. Porto Alegre: a Sociedade [cited 2019 April 18]. Informe Técnico. **Campanha Nacional de Vacinação Contra a Influenza**, Brasília, 2014. [Adobe Acrobat document, 35p.]. Available from: http://sprs.com.br/sprs2013/bancoimg/140402011250Informe_Campanha_Influenza_25_03_2014.pdf

SOLANO FDC. **Genes de virulência de *Pseudomonas aeruginosa* en hospitales de la Ciudad de Loja**. Tesis. Universidad de Guayaquil. 2017.

SOUZA ES et al. Mortalidade e riscos associados a infecção relacionada à assistência à saúde. **Texto Contexto Enfermagem**, 2015; 24(1): 220-228.

SOUZA MA. **Emergência e disseminação de Enterococo Resistente à Vancomicina em Hospital Universitário no Centro-Oeste do Brasil.** 2013. Dissertação (Mestrado). Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás.

STRATEVA T, MITOV I. Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Ann Microbiol**, 2011; V 61, p 717-732.

TACCONELLI E, CARRARA E, SAVOLDI A., HARBARTH S, MENDELSON M, MONNET DL. Y OUELLETTE M. “Descubrimiento, investigación y desarrollo de nuevos antibióticos: la lista de prioridades de la oms de bacterias resistentes a los antibióticos y tuberculosis”, **Lancet Infect Dis**, 2018, 18 (3): 318-327

TARAI B, DAS P KUMAR, KUMAR, D. Recurrent challenges for clinicians: emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, vancomycin resistance, and current treatment. **J Lab Physicians**. 2013;5:71-8.

TAVARES, CPM. **Klebsiella pneumoniae e fatores associados que contribuem para a resistência antimicrobiana: uma revisão de literatura.** 2019. 44 f. Monografia (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2019.

TORTORA GJ. et al. **Microbiologia**. 2012; 10ª Edição, Editora Artmed.

TORTORA GJ, FUNKE BR, CASE CL. 2013. **Introducción a la microbiología.** 9ª edición. Ed. Médica Panamericana. China.

TORTORA, GJ, FUNKE BR, CASE CL. **Microbiologia**. 2017; 12ª edição. Porto Alegre: ARTMED Editora Ltda.

UC-CACHÓN AH et al. High Prevalence of Antimicrobial Re-sistance Among Gram-Negative Isolated Bacilli in Intensive Care Units at a Tertiary-Care Hospital in Yucatán Mexico. **Medicina**, 2019; v.55, n. 588, p. 1-13.

VAARA M. Polymyxin derivatives that sensitize Gram-negative bacteria to other antibiotics. **Molecules**, 2019; 24(2):249.
<https://doi.org/10.3390/molecules24020249>

VASCONCELOS ATR. et al. The changing epidemiology of *Acinetobacter* spp. producing OXA carbapenemases causing bloodstream infections in Brazil: A BrasNet report. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 2015; v. 83(4), p. 382–385.

VIEIRA MAM. Ilhas de Patogenicidade / Pathogenicity islands / Islas de patogenicidad. **O Mundo da Saúde**, São Paulo: 2009;33(4):406-414.

VALDERRAMA CV. **Characterisation of the resistome and virulome of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with ventilator-associated**

pneumonia. Project submitted in partial fulfilment of MSc Degree in Molecular Biology and Biomedicine. Universidad de Cantabria. 2020.

VIEIRA PB, PICOLI SU. *Acinetobacter baumannii* Multirresistente: Aspectos Clínicos e Epidemiológicos. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde.** 2015; João Pessoa, v. 19, n. 2, p 151-156.

VINOGRADOV E, FRIRDICH E, MACLEAN LL, PERRY MB, PETERSEN BO, DUUS J, et al. Structures of lipopolysaccharides from *Klebsiella pneumoniae*: Elucidation of the structure of the linkage region between core and polysaccharide O chain and identification of the residues at the non-reducing termini of the O chains. **J Biol Chem.** 2002;277(28):25070–81.

WORLD HEALTH ORGANIZATION [homepage on the Internet]. Geneva: World Health Organization [cited 2019 April 18]. **The top 10 causes of death.** Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index1.html>

WORLD HEALTH ORGANIZATION [homepage on the Internet]. Geneva: World Health Organization [cited 2019 April 18]. **Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS).** Available from: http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/en/index.html

WORLD HEALTH ORGANIZATION [homepage on the Internet]. Geneva: World Health Organization [cited 2019 April 18]. **Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics.** Available from: https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The burden of health care-associated infection worldwide [Internet]. **WHO.** 2016 [cited 2018 by Sep 29] Available from: http://www.who.int/gpsc/country_work/burden_hcai/en/

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report on the Burden of Endemic Health Care-Associated Infection Worldwide. **Clean Care is Safer Care** [Internet]. 2011 [cited 2018 by Sep 29]. Available from: http://www.who.int/gpsc/country_work/burden_hcai/en/

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery and development of new antibiotics,** 2017.

WU D, WU C, ZHANG S, ZHONG Y. Risk Factors of Ventilator-Associated Pneumonia in Critically Ill Patients. **Front Pharmacol,** 2019; v. 10, p. 482, 2019.

WYRES KL, HOLT KE. *Klebsiella pneumoniae* como um traficante chave de genes de resistência a drogas de bactérias ambientais a clinicamente importantes. **Curr Opin Microbiol,** 2018; 45:131–139.

ZILBERBERG MD, KOLLEF MH, SHORR AF. Secular trends in *Acinetobacter baumannii* resistance in respiratory and blood stream specimens in the United States, 2003 to 2012: a survey study. **J Hosp Med.** 2016;11:21–6.

ANEXOS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE BACTÉRIAS ISOLADAS EM HOSPITAIS PÚBLICOS E PRIVADOS DE SÃO LUÍS, MA.

Pesquisador: AFONSO GOMES ABREU JUNIOR

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 68915816.2.0000.5084

Instituição Proponente: centro universitario do maranhão-uniceuma

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.221.431

Apresentação do Projeto:

Membros da família Enterobacteriaceae são importantes patógenos humanos, especialmente em ambientes hospitalares, onde causam os mais variados tipos de infecção, tais como infecções do trato urinário, pneumonias, meningites, abscessos, feridas cirúrgicas, sepse, entre outras. A patogenicidade e a alta incidência de isolados resistentes a vários antimicrobianos presentes nessa família são preocupantes. São de grande importância, não apenas por seus fatores de virulência, mas porque apresentam resistência a várias classes de antimicrobianos. Além destas, bactérias Gram-positivas têm grande importância, principalmente em ambientes hospitalares, a exemplo do *Staphylococcus aureus*, que nas últimas décadas tem adquirido papel de destaque, não só por ser um patógeno humano responsável por infecções superficiais e sistêmicas, que atingem indivíduos em diferentes faixas etárias, como também pela sua multirresistência aos antimicrobianos utilizados na terapêutica. Este estudo tem como objetivo principal caracterizar por métodos fenotípicos e moleculares bactérias isoladas de pacientes em hospitais públicos e privados de São Luís- MA. Dentre as principais enfermidades causadas por esses patógenos e que acometem pacientes hospitalizados, a sepse, a pneumonia e as infecções dos tratos gastrintestinal e urinário possuem um grande destaque. Levando em consideração que essas infecções, além de contribuir para um elevado custo nas internações hospitalares e de serem importantes causa de mortalidade

Endereço: DOS CASTANHEIROS

Bairro: JARDIM RENASCENÇA

UF: MA

Município: SAO LUIS

CEP: 65.075-120

Telefone: (98)3214-4212

E-mail: cep@ceuma.br



Continuação do Parecer: 2.221.431

nas UTIs, a identificação rápida dessas bactérias em seu foco de origem, bem como a caracterização molecular de fatores de virulências são necessários para que complicações fatais, como a sepse, sejam evitadas. Sendo assim, este estudo será útil como suporte para adoção de políticas eficazes de controle das infecções e do uso adequado dos antibióticos dentro das unidades hospitalares, além de contribuir para um melhor esclarecimento das causas de sepse e das infecções causadas por micro-organismos resistentes.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Caracterizar por métodos fenotípicos e moleculares bactérias isoladas de pacientes em hospitais públicos e privados de São Luís-MA.

Objetivo Secundário:

Identificar bactérias causadoras de sepse, infecções pulmonares, infecções urinárias, dentre outras; Determinar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das bactérias isoladas; Correlacionar a frequência de isolamento das amostras produtoras de ESBL com o sítio anatômico e os setores hospitalares envolvidos; Determinar os fatores de virulência e mecanismos de resistência associados às infecções.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e benefícios foram descritos corretamente e estão de acordo com as normas éticas previstas pela resolução CNS 466/12.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma resubmissão e todas as pendências foram atendidas pelo pesquisador.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os documentos obrigatórios foram apresentados e encontram-se corretamente preenchidos.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

O pesquisador deve apresentar relatório final.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: DOS CASTANHEIROS

Bairro: JARDIM RENASCENÇA

UF: MA

Município: SAO LUIS

CEP: 65.075-120

Telefone: (98)3214-4212

E-mail: cep@ceuma.br



Continuação do Parecer: 2.221.431

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_812623.pdf	29/06/2017 22:40:18		Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Carta_CEP.pdf	29/06/2017 22:11:33	AFONSO GOMES ABREU JUNIOR	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Afonso_Abreu.pdf	29/06/2017 22:10:59	AFONSO GOMES ABREU JUNIOR	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao_Instituicao.pdf	05/05/2017 11:49:08	AFONSO GOMES ABREU JUNIOR	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Dispensa_de_TCLE.pdf	05/05/2017 11:48:17	AFONSO GOMES ABREU JUNIOR	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	21/10/2016 00:11:57	AFONSO GOMES ABREU JUNIOR	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO LUIS, 15 de Agosto de 2017

Assinado por:
RUDYS RODOLFO DE JESUS TAVAREZ
(Coordenador)

Endereço: DOS CASTANHEIROS

Bairro: JARDIM RENASCENCA

CEP: 65.075-120

UF: MA

Município: SAO LUIS

Telefone: (98)3214-4212

E-mail: cep@ceuma.br

Article

New Insights into the Antimicrobial Action of Cinnamaldehyde towards *Escherichia coli* and Its Effects on Intestinal Colonization of Mice

Wellison A. Pereira ¹, Carlos Drielson S. Pereira ¹, Raíssa G. Assunção ^{1,2}, Iandeyara Savanna C. da Silva ^{1,2}, Fabrícia S. Rego ¹, Leylane S. R. Alves ¹, Juliana S. Santos ¹, **Francisco Jonathas R. Nogueira** ^{1,2}, Adrielle Zagnignan ¹, Thomas T. Thomsen ³, Anders Løbner-Olesen ³, Karen A. Krogfelt ⁴, Luís Cláudio N. da Silva ¹ and Afonso G. Abreu ^{1,2,*}

- ¹ Laboratório de Patogenicidade Microbiana, Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana, Universidade Ceuma, São Luís 65075-120, Brazil; well.ap@usp.br (W.A.P.); drielsonn.sousa@gmail.com (C.D.S.P.); raissa_guara@hotmail.com (R.G.A.); savannacarsi@gmail.com (I.S.C.d.S.); fabricia_sr@hotmail.com.br (F.S.R.); leylanesusy@hotmail.com (L.S.R.A.); julianass98@hotmail.com (J.S.S.); frjonathas@outlook.com (F.J.R.N.); adrielle.zagnignan@ceuma.br (A.Z.); luiscn.silva@ceuma.br (L.C.N.d.S.)
- ² Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís 65080-805, Brazil
- ³ Department of Functional Genomics, University of Copenhagen, 2200 Copenhagen, Denmark; thomas.thomsen@bio.ku.dk (T.T.T.); lobner@bio.ku.dk (A.L.-O.)
- ⁴ Department of Science and Environment, Roskilde University, 4000 Roskilde, Denmark; kak@ssi.dk
- * Correspondence: afonso.abreu@ceuma.br



Citation: Pereira, W.A.; Pereira, C.D.S.; Assunção, R.G.; da Silva, I.S.C.; Rego, F.S.; Alves, L.S.R.; Santos, J.S.; Nogueira, F.J.R.; Zagnignan, A.; Thomsen, T.T.; et al. New Insights into the Antimicrobial Action of Cinnamaldehyde towards *Escherichia coli* and Its Effects on Intestinal Colonization of Mice. *Biomolecules* **2021**, *11*, 302. <https://doi.org/10.3390/biom11020302>

Academic Editor: Hani S. El-Nezami
Received: 15 January 2021
Accepted: 10 February 2021
Published: 18 February 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: *Escherichia coli* is responsible for cases of diarrhea around the world, and some studies have shown the benefits of cinnamaldehyde in the treatment of bacterial disease. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effects of cinnamaldehyde in mice colonized by pathogenic *E. coli*, as well as to provide more insights into its antimicrobial action mechanism. After determination of minimum inhibitory (MIC) and minimum bactericidal (MBC) concentrations, the interference of cinnamaldehyde in macromolecular pathways (synthesis of DNA, RNA, protein, and cell wall) was measured by incorporation of radioisotopes. The anti-adhesive properties of cinnamaldehyde towards *E. coli* 042 were evaluated using human epithelial type 2 (HEp-2) cells. Intestinal colonization was tested on mice, and the effect of cinnamaldehyde on *Tenebrio molitor* larvae. Cinnamaldehyde showed MIC and MBC values of 780 µg/mL and 1560 µg/mL, respectively; reduced the adhesion of *E. coli* 042 on HEp-2 cells; and affected all the synthetic pathways evaluated, suggesting that compost impairs the membrane/cell wall structure leading bacteria to total collapse. No effect on the expression of genes related to the SOS pathway (*sulA* and *dinB1*) was observed. The compound did not interfere with cell viability and was not toxic against *T. molitor* larvae. In addition, cinnamaldehyde-treated mice exhibited lower levels of colonization by *E. coli* 042 than the untreated group. Therefore, the results show that cinnamaldehyde is effective in treating the pathogenic *E. coli* strain 042 and confirm it as a promising lead molecule for the development of antimicrobial agents.

Keywords: cinnamaldehyde; intestinal colonization; natural products

1. Introduction

Escherichia coli is an important pathogen responsible for numerous cases of diarrhea worldwide, representing a serious problem for immunocompromised individuals, and especially children [1–4]. Several reports have associated diarrhea with significant delays in childhood development [1,3,5].

In a study carried out in South America, Africa and Asia, in children and adults with diarrhea, the predominant pathogen isolated in fecal samples was enteroaggregative *E. coli*