

Relatório do Projeto de Pesquisa

Título: Matriz de cartões *TaqMan* e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas aplicadas ao controle e profilaxia de resistência aos antimicrobianos em bactérias Gram-negativas no Hospital Universitário em Fortaleza, CE, Brasil;

Coordenador: Aldo Ângelo Moreira Lima, PhD, PQ CNPq 1A, Comitê Microbiologia e Parasitologia;

Instituição executora/UF: Universidade Federal do Ceará

Linha Temática de Pesquisa: **Linha 2** - Desenvolvimento e inovação em novos métodos diagnósticos para controle e combate à resistência aos antimicrobianos. Nesta linha as pesquisas devem buscar o desenvolvimento de novos métodos diagnósticos que tenham acurácia, sejam rápidos e acessíveis para o diagnóstico efetivo das infecções, de forma a subsidiar o controle e combate à resistência aos antimicrobianos;

Instituições participantes: Universidade Federal do Ceará (UFC); Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares (EBSERH) - Hospital Universitário Walter Cantídeo (HUWC), UFC; INCT-Biomedicina; University of Virginia (UVa), VA, USA.

Matriz de cartões *TaqMan* e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas aplicadas ao controle e profilaxia de resistência aos antimicrobianos em bactérias Gram-negativas no Hospital Universitário em Fortaleza, CE, Brasil

Resumo

Este estudo avaliou os fenótipos de resistência aos antimicrobianos e desenvolveu métodos moleculares dos genótipos de resistência para o controle e profilaxia em isolados amostrais de bactérias Gram-negativas (GNB) adquiridas na unidade de terapia intensiva (UTI) no Hospital Universitário em Fortaleza, CE, Brasil.

Métodos: O total de 259 amostras adquiridas na UTI foram utilizadas para culturas automatizadas para GNBs e os isolados utilizados para os testes de susceptibilidade aos antimicrobianos (MIC) por micro diluição em caldo de cultura utilizando técnicas do *Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI)* no período de 2019-2021. As GNBs isoladas e com fenótipos de resistências em *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Escherichia coli* foram examinadas quanto aos fenótipos de resistência, os três mais frequentes isolados foram examinados para os genótipos de resistências aos beta-lactâmicos, incluindo penicilinas, cefalosporinas, ecarbapenemas, aminoglicosídeos e quinolonas utilizando a tecnologia de qPCR em tempo real. O estudo está em processo final de validar, identificar e quantificar as expressões das principais proteínas de resistências através da cromatografia líquida acoplada ao espectro de massas (LC-MS/MS). Todos estes métodos permitirão, na prática, reduzir o tempo dos diagnósticos, caracterizar os fenótipos moleculares e ampliar os conhecimentos qualitativos e quantitativos dos genes e das expressões proteicas relacionadas aos mecanismos de resistências aos antimicrobianos com alta sensibilidade, especificidade e acurácia. **Resultados:** Das 259 amostras coletadas (uma não houve crescimento bacteriana), isolamos e identificamos 122 (47%) cepas de *K. pneumoniae*, 61 (24%) *A. baumannii*, 54 (21%) *P. aeruginosa*, 10 (4%) *E. coli*, 6 (2%) *E. cloacae* e 5 (1,8%) outras bactérias. Os locais de origem das amostras foram 116 (45%) aspirado traqueal, 67 (26%) swab retal, 32 (12%) sangue e 44 (17%) outros locais de coleta. O fenótipo de resistência a penicilinas e cefalosporinas variou de 62-100%, e para as carbapenemas entre 56-98% para *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, e *P. aeruginosa*. O fenótipo para os beta-lactâmicos associados com inibidores de beta-lactamases (exceção da ceftazidima + avibactam) variou de 78-100%. A resistência a carbapenemas variou de 17-93% nos isolados de bactérias gram-negativa. O percentual de resistência dos principais isolados variou de 14-96% para aminoglicosídeos e quinolonas. *K. pneumoniae* apresentou alto percentual de resistência para colistina (50%; 3/6). O percentual de MDR e XDR nas bactérias GNB variou entre 30-95%. O percentual de detecção dos genes de beta-lactamase classificadas como penicilinase variou de 18-91% para *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, e *P. aeruginosa*. A detecção de beta-lactamases plasmidial e com espectro estendido foi heterogêneo nessas bactérias. As serina- e metalo-carbapenemases foram detectadas frequentemente, variando entre 10-91% dos isolados testados. O gene AAC(3') foi identificado em 43% dos isolados de *K. pneumoniae* e as bombas de efluxo foram identificados com alta frequência variando entre 10-100% dos isolados de *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, e *P. aeruginosa*. O percentual de concordância dos fenótipos de resistência das bactérias gram-negativo e a presença dos genes de bomba de efluxo *acrAB_tolC* e AAC(3') variou entre 86-100% nas diversas classes de antimicrobianos analisados ($P < 0,05$). A concordância dos genótipos de resistência das bactérias gram-negativo e a presença dos genes CTX_M_5, OXA_24_40, OXA_51, e ACC(3') variou entre 38-100% nas classes de antimicrobianos dos fenótipos MDR e XDR analisados ($P < 0,05$). **Conclusões:** Os resultados mostram que em geral os fenótipos de resistência aos antimicrobianos foram altos e a ocorrência de MDR, XDR e resistência as carbapenemas foram detectados com alta frequência nos isolados de GNBs dos pacientes na UTI. Ademais, a frequência alta dos genes de resistência detectados nos isolados de GNBs é consistente com a alta prevalência do fenótipo de resistência nesses isolados.

Palavras chaves: fenótipo de resistência aos antimicrobianos, genótipo de resistência, bactérias gram-negativo, cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa.

Matrix of TaqMan cards and liquid chromatography coupled to mass spectrometry applied to the control and prophylaxis of antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria at the University Hospital in Fortaleza, CE, Brazil

Abstract

This study evaluated antimicrobial resistance phenotypes and developed molecular methods of resistance genotypes for control and prophylaxis in sample isolates of Gram-negative bacteria (GNB) acquired at the intensive care unit (ICU) at the University Hospital in Fortaleza, CE, Brazil. **Methods:** A total of 259 samples acquired in the ICU were used for automated cultures for GNBs and the isolates used for antimicrobial susceptibility tests (MIC) by micro dilution in culture broth using techniques from the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) in the period 2019-2021. GNBs isolated and with resistance phenotypes in *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Escherichia coli* were examined for resistance phenotypes, and the three most frequent isolates were examined for genotypes of resistance to beta-lactams, including penicillins, cephalosporins, and carbapenems, aminoglycosides and quinolones using real-time qPCR technology. The study is in the final process of validating, identifying, and quantifying the expressions of the main resistance proteins through liquid chromatography coupled to mass spectrum (LC-MS/MS). All these methods will allow, in practice, to reduce diagnosis time, characterize molecular phenotypes and expand qualitative and quantitative knowledge of genes and protein expressions related to antimicrobial resistance mechanisms with high sensitivity, specificity and accuracy. **Results:** Of the 259 samples collected (one had no bacterial growth) we isolated and identified 122 (47%) strains of *K. pneumoniae*, 61 (24%) *A. baumannii*, 54 (21%) *P. aeruginosa*, 10 (4%) *E. coli*, 6 (2%) *E. cloacae* and 5 (1.8%) other bacteria. The sample origin sites were 116 (45%) tracheal aspirate, 67 (26%) rectal swab, 32 (12%) blood and 44 (17%) other collection sites. The phenotype of resistance to penicillins and cephalosporins ranged from 62-100%, and for carbapenems between 56-98% for *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, and *P. aeruginosa*. The phenotype for beta-lactams associated with beta-lactamases inhibitors (except ceftazidime + avibactam) ranged from 78-100%. Carbapenem resistance ranged from 17-93% in gram-negative bacterial isolates. The percentage of resistance of the main isolates ranged from 14-96% for aminoglycosides and quinolones. *K. pneumoniae* showed a high percentage of resistance to colistin (50%; 3/6). The percentage of MDR and XDR in GNB bacteria ranged from 30-95%. The detection percentage of beta-lactamase genes classified as penicillinase ranged from 18-91% for *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, and *P. aeruginosa*. The detection of plasmid and extended-spectrum beta-lactamases was heterogeneous in these bacteria. Serine- and metallo-carbapenemases were frequently detected, ranging from 10-91% of the isolates tested. The AAC(3') gene was identified in 43% of *K. pneumoniae* isolates and efflux pumps were identified with high frequency ranging from 10-100% of *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, and *P. aeruginosa* isolates. The percentage of agreement between the resistance phenotypes of gram-negative bacteria and the presence of the efflux pump genes *acrAB_tolC* and AAC(3') varied between 86-100% in the different classes of antimicrobials analyzed ($P < 0.05$). The concordance of gram-negative bacterial resistance genotypes and the presence of *CTX_M_5*, *OXA_24_40*, *OXA_51*, and *ACC(3')* genes ranged from 38-100% in the antimicrobial classes of the MDR and XDR phenotypes analyzed ($P < 0.05$). **Conclusions:** The results show that in general antimicrobial resistance phenotypes were high and the occurrence of MDR, XDR and carbapenem resistance were detected with high frequency in GNB isolates from ICU patients. In addition, the high frequency of resistance genes detected in GNB isolates is consistent with the high prevalence of the resistance phenotype in these isolates.

Keywords: antimicrobial resistance phenotype, resistance genotype, gram-negative bacteria, liquid chromatography coupled to mass spectrometry.

Justificativa da importância da proposta / Qualificação do problema:

Nas UTIs brasileiras, até 58% dos óbitos estão associados à ocorrência de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRASs). Essas infecções trazem grandes impactos econômicos, sendo responsáveis por 40% dos gastos em UTIs, pois prolongam o tempo de internação dos pacientes, elevando os gastos com assistência médica e condutas diagnósticas e terapêuticas ^{1,2}. Segundo o Centers for Disease Control and Prevention (CDC), as IRASs podem ser definidas como uma condição localizada ou sistêmica, resultante de uma reação adversa à presença de um agente infeccioso adquirido após admissão nos serviços de saúde ³. No Brasil, a Portaria 2.616 do Ministério da Saúde, publicada em 12 de maio de 1998, considera como IRAS qualquer infecção adquirida após a admissão do paciente no serviço de saúde, manifestadas após 48 horas da admissão ou antes desse período quando relacionada a procedimentos invasivos ⁴. Devido à pressão seletiva exercida pelo grande uso de antimicrobianos e permanência a longo prazo de pacientes com sistema imunológico comprometido, infecções relacionadas a microrganismos multirresistentes (MDROs, do inglês, multidrug-resistant organisms) são prevalentes nas dependências das UTIs ^{5,6,7}. As IRASs causadas por MDROs são consideradas uma ameaça global à saúde pública, pois limitam ou até mesmo inviabilizam as opções terapêuticas disponíveis, o que aumenta a gravidade e, conseqüentemente, os índices de morbidade e mortalidade dos acometidos, elevando o tempo de internação dos pacientes e os custos hospitalares ⁸.

No Brasil, os dados sobre IRASs são pouco documentados, devido à consolidação reduzida das informações por diversos hospitais, dificultando o conhecimento da extensão do problema no país. No HUWC, levantamento estatístico interno realizado de 01 de outubro de 2017 a 31 de março de 2018, evidenciou que 121 microrganismos foram isolados de 118 amostras biológicas provenientes de pacientes internados na UTI clínica do HUWC. As bactérias Gram-negativas (GNBs) foram mais prevalentes, sendo *Klebsiella pneumoniae* o microrganismo predominante (60/121; 49,59%), seguido por *Pseudomonas aeruginosa* (14/121; 11,57%). Dentre os isolados de *K. pneumoniae*, 100% e 98% foram resistentes às cefalosporinas e à ciprofloxacina, respectivamente, e cerca de 95% foram resistentes aos carbapenêmicos.

Anualmente, desde 2008, a Organização Mundial da Saúde (OMS) realiza a campanha da Aliança Mundial pela Segurança do Paciente intitulada “Uma Assistência Limpa é uma Assistência mais Segura”, que objetiva a conscientização dos profissionais de saúde para a higienização correta das mãos, principalmente antes e depois da manipulação de pacientes, objetivando evitar a propagação de microrganismos entre os mesmos ⁹. No Brasil, existem diversas leis e portarias que objetivam controlar as IRAS, podendo-se destacar a lei nº 9.431, de 6 de janeiro de 1997, que obriga os hospitais do país a manter Programa de Controle de Infecções Hospitalares (PCIH), objetivando instituir medidas que reduzam ao máximo as possíveis incidências e agravos das infecções em ambiente hospitalar ¹⁰.

O HUWC vem, ao longo dos anos, elaborando estratégias para reduzir os índices de IRAS dentro da instituição. Além de um Serviço de Controle de Infecção Hospitalar (SCIH) atuante, gestores e colaboradores têm se unido em busca de um atendimento de melhor qualidade para os pacientes. Exemplo disso é o recém-lançado programa “120 Contra a Infecção”, que tem como objetivo central reduzir em 30%, até 2019, e em 50%, até 2020, determinados tipos de infecções ¹¹.

A necessidade de abordagem aprofundada referente à prevenção e controle de infecções é uma estratégia útil na promoção da segurança do paciente. Considerando a complexidade e a gravidade das IRASs, especialmente daquelas causadas por MDROs entre pacientes críticos, tornando-se de fundamental importância o estudo de tais quadros infecciosos. Portanto, diagnosticar em curto prazo (<2,5 horas) com alta sensibilidade e especificidade e com métodos moleculares práticos e inovadores dos isolados de MDR nos pacientes internados em leitos de UTI, assim como identificar os fenótipos de resistência, bem como os mecanismos moleculares pelos quais eles se tornam resistentes é uma emergência pública, tendo em vista a dificuldade de tratamento pela ineficácia das opções terapêuticas atuais, o elevado impacto financeiro que eles representam no orçamento dos serviços de saúde e os altos índices de morbidade e mortalidade associados aos mesmos.

Objetivo geral: Este estudo irá desenvolver e inovar novos métodos moleculares para o controle e combate em isolados amostrais de bactérias Gram-negativas (GNBs) adquiridas na unidade de terapia intensiva (UTI) e resistentes aos antimicrobianos beta-lactâmicos, aminoglicosídeos e quinolonas em uso no Hospital Universitário em Fortaleza, CE, Brasil.

Objetivos específicos:

- (a) Avaliar tendências e padrões em isolados amostrais adquiridas na unidade de terapia intensiva (UTI) resistentes aos antimicrobianos beta-lactâmicos, aminoglicosídeos e quinolonas causados por bactérias Gram-negativas (GNBs);
- (b) Desenvolver plataforma de diagnóstico molecular utilizando a tecnologia qPCR para o controle e combate às infecções por GNBs isoladas de *Klebsiella* spp., *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Escherichia coli* identificando, simultaneamente, pelo menos 32 genes de resistências para os beta-lactâmicos incluindo penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas, aminoglicosídeos e quinolonas; e
- (c) Identificar, validar e quantificar as expressões das principais proteínas relacionadas aos mecanismos de resistências antimicrobianas, utilizando o método de cromatografia líquida acoplada ao espectro de massas (LC-MS/MS).

Material e Métodos

Obtenção dos isolados bacterianos

O período do estudo foi de 23/04/2019 a 29/05/2021. Foram coletadas e examinadas nesse período 259 amostras de pacientes internados na UTI clínica do HUWC, em Fortaleza-CE, envolvendo diferentes sítios anatômicos e cujo agente etiológico envolvido foi cultivado e identificado no laboratório de microbiologia. Foram incluídos no estudo isolados bacterianos provenientes de: (a) infecções da corrente sanguínea (hemocultura - HCU) e outros sítios de infecção considerados nobres, como líquidos cefalorraquidianos (LCR), pleural, peritoneal, pericárdio, sinovial, entre outros; (b) infecções do trato urinário; (c) de secreções, como lavado bronco-alveolar, aspirado traqueal, escarro, fragmentos de pele, órgãos e ossos, drenagens e abscessos, ferida cirúrgica e outros sítios anatômicos que apresentem indícios de infecção quando avaliados pelo médico clínico do hospital; e (d) culturas de *swab* retal para vigilância, sem infecção aparente.

Métodos microbiológicos clássicos para isolar, identificar as bactérias, determinar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e armazenagem no biobanco das cepas de GNBs

Para diagnosticar agentes etiológicos potenciais, as amostras de HCU e outros líquidos nobres foram inoculadas em frascos específicos e incubadas no equipamento BacT/Alert® 3D (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France), um sistema de detecção microbiana automatizado, colorimétrico, capaz de agitar e incubar os frascos na temperatura ideal, com sensores de membrana para detecção contínua do crescimento microbiano. Equipamentos automatizados para realização de hemoculturas possibilitam leituras dos frascos em intervalos curtos e contínuos de tempo, possibilitando, desse modo, determinar a curva de crescimento do microrganismo e gerando um gráfico de positividade de fácil acompanhamento. Apresentam vantagem em relação às metodologias manuais, principalmente quanto à rapidez dos resultados e à diminuição do trabalho técnico e do risco de contaminação da amostra. A principal desvantagem do método é o custo ainda elevado^{12,13}. Os outros materiais biológicos foram semeados em meios de cultura específicos através de

técnica de semeadura qualitativa ou quantitativa, conforme preconizado pela ANVISA (2013)¹⁴, a fim de se obter colônias isoladas. As placas foram incubadas a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 18-24 horas.

Os isolados bacterianos foram identificados e testados quanto à sua susceptibilidade aos antimicrobianos pelo método automatizado VITEK® 2 Compact (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France), de acordo com as recomendações do fabricante. As concentrações inibitórias mínimas foram interpretadas de acordo com o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Para o controle de qualidade dos testes de susceptibilidade foram utilizadas cepas da *American Type Culture Collection* (ATCC). O uso de equipamentos automatizados na identificação e teste de susceptibilidade aos antimicrobianos (TSA) permite melhorar a eficiência do laboratório, reduzindo a mão de obra e liberando resultados confiáveis em menor intervalo de tempo^{15,16}. Testes microbiológicos adicionais foram empregados para confirmar os resultados obtidos, se necessário. Os isolados bacterianos foram armazenados em meio de cultura e condições adequadas para sua preservação até a realização dos testes adicionais no Núcleo de Biomedicina (NUBIMED), Faculdade de Medicina (FAMED), Universidade Federal do Ceará (UFC). Os isolados foram categorizados como multidroga resistente (MDR) ou resistência estendida (XDR) de acordo com critérios definidos em 2012 pelo conjunto europeu e americano Centros de Controle de Doenças (Magiorakos et al., 2012)¹⁷. Esses critérios foram para definir MDR como não suscetível a ≥ 1 agente em ≥ 3 classes de antimicrobianos e XDR como suscetível a ≤ 2 classes. Ampicilina, ceftriaxona, imipenama, ciprofloxacina, e resistência a gentamicina foram usados como indicadores de resistência classe-específica a penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas, fluoroquinolonas, e aminoglicosídeos, respectivamente.

Desenho e validação de iniciadores de genes relacionados a resistência aos antimicrobianos

Sequências de genes relacionados a resistência á antibióticos em bactérias Gram-negativas foram obtidas do banco de dados CARD (em inglês The Comprehensive Antibiotic Resistance Database)¹⁸. Observamos que existem inúmeras variações para alguns genes. Variações estas que são expressas em diferentes microrganismos. Essas variações na sequência de nucleotídeos precisam ser consideradas no desenho de primers para o diagnóstico molecular desses genes. Ignorar a existência de variações criaria primers que não detectariam todas as variantes do gene. Se utilizados para o diagnóstico, esses primers acarretariam o diagnóstico de falso negativos. Portanto, as sequências de todas as variantes de cada um dos genes de resistência foram obtidas banco de dados CARD¹⁸. As sequências de todas as variantes de cada gene foram alinhadas utilizando o software clustalW^{19,20}, após o alinhamento a sequência consenso com 95% de conservação entre todas as variantes foi obtida. Os iniciadores, ou primers, para o diagnóstico de cada gene foram desenhados pelo software primer-BLAST²¹ utilizando a sequência consenso obtida pelo alinhamento. As sequências dos iniciadores senso (F) e antisenso (R) de cada gene estão representadas na **Tabela 1**.

A metodologia descrita acima não foi utilizada para o desenho de primers dos genes *IMP*, *OXA*, *CTX-M*, *PER* e *ampC*. Estes genes não possuem uma sequência consenso ($> 95\%$ semelhante) entre todas as variantes, o que impossibilita o desenho de um único primer para todas as variantes. Deste modo, criamos um cladograma com base na similaridade entre as sequências das variantes utilizando o clustalW software que organizou as variantes semelhantes em clados específicos^{19,20}. O diagnóstico desses genes será realizado com múltiplos primers. Cada primer irá reconhecer as variantes que se encontram no mesmo clado, e, portanto, apresentam maior similaridade em suas sequências.

O diagnóstico de complexos proteicos de bombas de efluxo MEX (do inglês multidrug efflux protein complex) foi feito baseado nas proteínas de membrana (canais ou transportadores) presentes em cada complexo de bombas de efluxo. Sequências foram obtidas na CARD database e primers específicos foram desenhados utilizando o primer-BLAST software^{18,21} (Resultados na **Tabela 2**).

Os isolados bacterianos foram cultivados em caldo tripticase de soja por 16h em estufa bacteriológica a 37°C , a 200 rpm, para extração do DNA bacteriano. O DNA total foi extraído utilizando o kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega, Madison, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. Todas as amostras foram quantificadas por espectrofotometria com a utilização do NanoDrop 2000 (Thermo Fisher

Sientific, Waltham, Massachusetts, USA) e conservadas em freezer -80 °C até sua utilização nos experimentos. Inicialmente, foi realizado uma reação de qPCR com diversas amostras para definir quais seriam utilizadas como controle positivo para os novos iniciadores desenhados. Foi realizado uma reação de qPCR utilizando a enzima GoTaq qPCR (Promega, Madison, USA) para amplificação dos genes alvo, usando os novos primers desenhados. Após a amplificação inicial, correu-se uma reação de gradiente de temperatura para definir a melhor temperatura de anelamento dos iniciadores. As amostras que tiveram amplificação positiva da reação foram separadas por eletroforese em gel de agarose a 2% e coradas com brometo de etídeo para visualização no transiluminador ChemiDoc XRS (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). O tamanho do amplicon foi confirmado, e a banda foi cortada e isolada do gel de agarose utilizando um bisturi estéril. A banda foi cortada do gel de agarose foi fragmentada e colocada dentro de tubo de 1,5 mL contendo filtro embebido com tampão TE. O tubo contendo o gel foi centrifugado a 4000 RPM por 10 min. Após a centrifugação o filtro foi descartado e a solução filtrada foi transferida para um tubo de 2mL, que seguiu para a extração utilizando o protocolo do kit Ribospin TM vDR (GeneAll, Seoul, Coreia do Sul).

O material genético isolado foi amplificado por qPCR e este produto foi quantificado e diluído a uma concentração de 250 ng/uL utilizado para a análise de curva padrão e limite de detecção dos primers, o DNA foi diluído para uma concentração de 1ng/uL e foram analisados nove pontos com fator de diluição 1:8. Destes nove pontos pelo menos 5 foram utilizados para a curva padrão dependendo do limite de detecção dos primers. As amostras utilizadas para o controle positivo de cada iniciador estão descritas na **Tabela 3**. A eficiência da reação de cada iniciador desenhado foi testada usando os controles positivos isolados das amostras clínicas. A eficiência da qPCR foi calculada seguindo os parâmetros determinados por Ruijter, Barnewall²² em 2021. Apenas reações com eficiência entre 95 e 105% foram usados no diagnóstico molecular de genes de resistência, primers cuja eficiência foi inferior a 95% ou superior a 105% foram descartados e novos primers foram desenhados para o gene alvo.

Ensaios com cromatografia líquida – espectrômetro de massas (LC-MS/MS)

Os ensaios com LC-MS/MS estão em processo no Centro de Cromatografias e Espectrometria de Massa (CCEM) do laboratório de doenças infecciosas (LDI-NUBIMED). O CCEM implementou recentemente um sistema de espectrômetro de massa LC-MS/MS através do aparelho QTRAP 5500 (AB SciexFramingham, MA, USA) de alta resolução conectado diretamente ao sistema de cromatografia líquida de alta performance (HPLC; Elkgent LC 100XL), facilitando a análise de compostos polares e termolábeis através da relação massa/carga (m/z). O instrumento inclui a seleção de íons, espectro de massa quadrupolar triplo em alta resolução (HR). Nestes experimentos serão quantificados em amostras os peptídeos e proteínas alvos dentro do espectro de análises. Os biomarcadores serão confirmados previamente nos ensaios por RT-PCR. Os ensaios de padronizações serão realizados a partir de padrões adquiridos na Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA).

Preparação dos padrões usados e validação dos parâmetros testados

A partir dos padrões de cada analito analisado (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), serão preparadas as concentrações iniciais de 200 µg/mL e, a partir destas soluções, serão preparadas soluções de trabalho de 20 µg/mL em uma mistura ACN/H₂O miliq (50:50). E através destas, serão preparadas diluições a partir da solução inicial (20 µg/mL), obtendo-se as seguintes concentrações: 5, 10, 50, 100, 500, 1000, 1500 e 2000 ng/mL de cada analito, que serão armazenadas a 4°C. A partir das dosagens dessas amostras serão derivados os parâmetros de validação do método, tais como os “r” das curvas de calibrações, limite de detecção (ng/mL), limite de quantificação (ng/mL), média de recuperação (%), desvio padrão, limite de detecção do método (ng/mL) e limite de quantificação do método (ng/mL). Todos estes parâmetros serão usados para a avaliação do grupo considerado inter-experimentos. A dosagem de apenas uma concentração (500 ng/mL) de cada analito, será avaliada em diferentes dias para a determinação da validação do grupo considerado de intra-experimentos.

Reações múltiplas monitoradas (MRM) e otimização por análise de injeção de fluxo (FIA)

O modo MRM será realizado para cada analito, objetivando a otimização das condições experimentais específicas de detecção do espectro de massas (MS). Uma injeção (Hamilton-gastight®) será completada ao volume de 1 mL da solução padrão na concentração de 5 ng/mL, acoplada ao Turbo V™ do QTRAP 5500. Será indicada a faixa de varredura em unidade de massa atômica conforme a massa original do analito, assim a região analítica detectará a massa específica do analito avaliado. Esta massa atômica será selecionada e posteriormente em modo negativo de ionização, a região analítica irá fragmentá-la, quantificando os 5 íons fragmentados que serão mais bem identificados em escala Log₁₀ de quantificação. Os parâmetros do método de análise por injeção de fluxo serão padronizados usando uma injeção direta na concentração de 5 ng/mL diretamente no espectro de massas por meio da cromatografia líquida de alta performance (HPLC), sem a presença da coluna cromatográfica, assim serão otimizadas as condições de injeções pelo HPLC. Após os testes de otimizações dos analitos padrões, iniciaremos a preparação e avaliação das amostras dos isolados de GNBs.

Preparação das amostras para os ensaios com LC –MS/MS

Será utilizado um método previamente descrito^{23,24}. Os antimicrobianos comercialmente disponíveis (Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA) serão diluídos em NaCl a 0,45% para obter alíquotas de 5 mg/mL. Alíquotas serão armazenadas a -80 ° C até o uso por um máximo de 14 dias. Após o período overnight de uma cultura bacteriana em ágar Mueller-Hinton a 37 ° C, uma quantidade de 10 µL do tamanho de uma alça da cultura de cada GNBs previamente identificada e selecionada será adicionada à 1 mL de uma solução contendo NaCl a 0,45% com 0,25 mg/mL de cada antimicrobiano. A suspensão será incubada a 37 ° C durante 1 h com agitação suave. Depois de centrifugação a 12.000 × g por 2 min, 0,5 mL do sobrenadante será adicionado em tubos de *ependorf* em triplicata na placa de 108 poços do autosampler para injeções no LC-MS/MS. As medidas serão realizadas por detecções de *m/z* no MS/MS de cada analito.

Condições do LC - MS / MS para a análise das amostras

O HPLC Elkgent LC 100XL Agilent (Santa Clara, EUA) contém em série: bomba, *auto sampler*, forno de coluna acoplado ao espectrômetro de massa triplo quadrupolo Q-Trap 55000 da AB Ciex (Framingham, MA, USA) com ionização por *eletropray* no modo íon negativo. A separação cromatográfica será testada com coluna analítica C₁₈. O gradiente ocorrerá com a fase móvel partindo de 75% de acetonitrila em 0,1% de ácido fórmico (eluente B) a 80% de H₂O miliq em 0,1% de ácido fórmico (eluente A; pH = 6,84) em 5 min, com um período de equilíbrio por 2,5 min, retornando a 75% do eluente B em 0,5 min e reequilibrando por 2 min antes da próxima injeção. O fluxo será de 300 µL/min com o volume de injeção de 20 µL. O tempo da análise de corrida será de 10 minutos, mantendo constante a temperatura do forno da coluna em 40 °C. Os parâmetros de operação MS/MS do triplo quadrupolo Q-Trap 5500 ocorrerá inicialmente na temperatura 500 °C, tendo uma constância de gás nebulizador a 50 psi, com uma cortina de gás (*curtaingas*) de 20 psi, com o turbo gás a 40 psi em uma voltagem de transferência de -3500 V. As condições de transições de íons no MS/MS serão inicialmente testadas com um potencial de entrada a -10 V, com um potencial de desagrupamento a -135 V e energia de colisão a -12 V. O potencial de saída da célula de colisão ocorrerá a -10 V. Todos os dados serão analisados e processados usando o Software Analyst 1.6.2.

Resultados

O total de 259 amostras foram coletadas na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) provenientes de aspirado traqueal (45%), *swab* retal (26%), sangue (12%) e de outros locais (17%) (**Figura 1A**). *K. pneumoniae*, *A. baumannii* e *P. aeruginosa* foram as três principais bactérias gram-negativo isoladas comprometendo um

percentual de 92% (234) do total de 258 amostras cultivadas e com isoladas bacterianas (**Figura 1B**). *K. pneumoniae* e *E. coli* testadas para susceptibilidade a penicilina (ampicilina) mostraram 100% (53/53) e 70% (7/9) resistentes, respectivamente (**Tabela 4 e Figura 1**). Em geral, os isolados de *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, e *E. coli* apresentaram fenótipo de resistência as cefalosporinas de segunda, terceira e quarta geração que variou entre 62% e 100% (**Tabela 4 e Figura 3**). *K. pneumoniae* e *A. baumannii* mostraram resistência as carbapenemas que variou entre 44% e 98% (**Tabela 4 e Figura 3C**). *E. coli* por outro lado apresentou um perfil de susceptibilidade alto as carbapenemas variando de 86% e 100%. *K. pneumoniae* mostrou ainda alta susceptibilidade para ceftazidima combinado com avibactam, entretanto apresentou fenótipo de resistência frequente, juntamente com *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, e *E. coli* que variou de 74% e 100% para ampicilina ou piperacilina combinado com sulbactam e tazobactam, respectivamente (**Tabela 5 e Figura 3B**). A **Tabela 6** mostra a susceptibilidade das bactérias gram-negativo isoladas frente aos antimicrobianos classificados em aminoglicosídeos, quinolonas, e outros, tigeciclina e colistina. A susceptibilidade das bactérias *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, e *P. aeruginosa*, aos aminoglicosídeos gentamicina e amikacina mostraram fenótipo de resistência intermediário variando entre 14% e 57% (**Figura 4A**). *E. coli* mostrou susceptibilidade aos aminoglicosídeos variando de 89% e 100%. Em geral, as bactérias gram-negativo isoladas mostraram susceptibilidade frente a tigeciclina e colistina, a exceção da *K. pneumoniae* que mostrou 50% de susceptibilidade frente a colistina (**Figura 4A**). A frequência de fenótipos multirresistentes de MDR variou de 37% a 95% nas bactérias gram-negativo isoladas (**Tabela 7 e Figura 4B**). O fenótipo de XDR variou de 30% a 89% nessas bactérias e apresentou uma relativa resistência também as carbapenemas, variando de 17% a 93% das bactérias gram-negativo isoladas e testadas.

A frequência dos genes de resistência associados com a produção de beta-lactamases nas três principais bactérias isoladas, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, e *P. aeruginosa*, são mostrados na **Tabela 8 e Figura 5**. Em geral, essas bactérias apresentam com grande frequência a presença dos genes de beta-lactamases produtoras de penicilinase, variando de 71% a 91% para o gene *TEM* e 18% a 86% para o gene *SHV*. Os genes de beta-lactamases plasmidiais apresentaram com heterogeneidade bastante variável nas bactérias gram-negativo isolados. Assim como para os genes de beta-lactamases de espectro estendido. O gene de serina-carbapenemase (*KPC*) foi relativamente frequente, variando de 27% a 91% e o gene de metalo-carbapenemases (*NDM*) variou de 10% a 18% nas bactérias gram-negativo testadas (**Tabela 8 e Figura 6A**). Os genes de bomba de efluxo foram também muito frequentes em *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, e *P. aeruginosa* (**Tabela 9 e Figura 7**). O gene *AAC(3')* para síntese de acetiltransferase e resistência associada aos aminoglicosídeos foi frequentemente (43%; 9/21) observado em *K. pneumoniae* (**Tabela 9 e Figura 6B**). A **Tabela 10** mostra as associações significativas entre os fenótipos e os genes de resistências ($P < 0,05$; Teste Qui-Quadrado da Razão de Verossimilhança). Observar o percentual de concordância entre 86-100% dos fenótipos de resistência das bactérias gram-negativo e a presença dos genes de bomba de efluxo *acrAB_tolC* e *AAC(3')* nas diversas classes de antimicrobianos analisados. Os dados da **Tabela 11** resumem as proporções de associações significativas dos fenótipos MDR, XDR com os genes de resistência ($P < 0,05$; Teste Qui-Quadrado da Razão de Verossimilhança). Notar o percentual de concordância entre 38-100% dos genótipos de resistência das bactérias gram-negativo e a presença dos genes *CTX_M_5*, *OXA_24_40*, *OXA_51*, e *ACC(3')* nas classes de antimicrobianos dos fenótipos MDR e XDR analisados. Com estes resultados recém analisados estamos em progresso de delineamento de quais proteínas são as mais importantes e associadas com os mecanismos de resistência de bactérias gram-negativo para identificar, validar e quantificar utilizando o método de cromatografia líquida acoplada ao espectro de massas (LC-MS/MS).

Referências

1. Guimarães AC, Donalisio MR, Santiago TH, Freire JB Mortality associated with nosocomial infection, occurring in a general hospital of Sumaré-SP, Brazil. Revista Brasileira de Enfermagem, 64(5): 864-869, 2011.

2. Marra AR, Camargo LF, Pignatari AC, Sukiennik T, Behar PR, Medeiros EA, Ribeiro J, Girão E, Correa L, Guerra C, Brites C, Pereira CA, Carneiro I, Reis M, de Souza MA, Tranches R, Barata CU, Edmond MB; Brazilian SCOPE StudyGroup. Nosocomial bloodstream infections in Brazilian hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(5): 1866-1871, 2011.
3. Centers for Disease Control and Prevention: CDC/NHSN Surveillance Definitions for Specific Types of Infections. Atlanta (US): CDC; 2014.
4. Ministério da Saúde do Brasil. Portaria nº. 2.616, de 12 de maio de 1998. Expediente diretrizes e normas para a prevenção e o controle das infecções hospitalares. Brasília (DF): Diário Oficial da União, 13 Mai 1998. Seção 1.
5. Carvalho MR, Moreira ICC, Neta FLA, Guimarães MSO, Viana VGF, Oliveira FW. Incidência de bactérias multirresistentes em uma unidade de terapia intensiva. *Revista Interdisciplinar*, 8(2): 75-85, 2015.
6. Amaral MVF, Roza LEM, Tonin JJ, Coronel JL, Zambon JDS, Vidaletti TB, Sobreira LS. Prevalência de microorganismos multirresistentes em um hospital universitário - análise de uma série histórica. In: II Congresso Brasileiro de Medicina Hospitalar - II CBMH. Blucher Medical Proceedings, 1(5). São Paulo: Editora Blucher, 2014. p.70.
7. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Investigação e Controle de Bactérias Multirresistentes. Rede Nacional Para Investigação de Surtos e Eventos Adversos em Serviços de Saúde (RENISS). Brasília: 2007. 21 p.
8. World Health Organization (WHO). Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance. Genebra: 2014. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf> Acesso em 18 de maio de 2018.
9. World Health Organization (WHO). Nota informativa: Aliança mundial pela segurança dos pacientes: o primeiro desafio global da segurança dos pacientes. Cuidado limpo é cuidado mais seguro. Yaoundé, Camarões: 2008. Disponível em: <http://www.who.int/gpsc/events/2008/Briefing_Note_AFRO_POR.pdf> Acesso em 15 de maio de 2018.
10. Ministério da Saúde do Brasil. Lei nº. 9.431, de 06 de janeiro de 1997. Dispõe sobre a obrigatoriedade da manutenção de programa de controle de infecções hospitalares pelos hospitais do País. Brasília (DF): Diário Oficial da União, 6 Jan 1997. Sec. 1, p. 265.
11. Hospital Universitário Walter Cantídio. Colaboradores se unem para reduzir infecções nas UTIs do HUWC. Fortaleza: 2018. Disponível em: <http://www.ebserh.gov.br/web/huwc-ufc/noticia-aberta/-/asset_publisher/JYdUOrTtibKl/content/id/3103857/2018-05-colaboradores-se-unem-para-reduzir-infeccoes-nas-utis-do-huwc> Acesso em 20 de maio de 2018.
12. Araújo MRE. Hemocultura: recomendações de coleta, processamento e interpretação dos resultados. *Journal of InfectionControl*, 1(1): 08-19, 2012.
13. Corrêa KLG. Diferença de tempo de positividade: método útil no diagnóstico de infecção de corrente sanguínea relacionada com cateter? *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 48(3): 195-202, 2012.
14. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Procedimentos Laboratoriais: da Requisição do Exame à Análise Microbiológica e Laudo Final. 2. ed. Brasília: 2013. Módulo 4.
15. Funke G, Funke-Kissling P. Evaluation of the new VITEK® 2 card for identification of clinically relevant Gram-negative rods. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(9): 4067-4071, 2004.

16. Calvo J, Cano ME, Pitart C, Marco F, Rodríguez-Martínez JM, Pascual A, Martínez-Martínez L. Evaluation of three automated systems for susceptibility testing of Enterobacteria containing qnrB, qnrS, and/or aac(6')-Ib-cr. *Journal of Medical Microbiology*, 49(9): 3343-3345, 2011.
17. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:268–81.
18. Alcock, B.P., et al., CARD 2020: antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res*, 2020. 48(D1): p. D517-d525.
19. Larkin, M.A., et al., Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 2007. 23(21): p. 2947-8.
20. Thompson, J.D., D.G. Higgins, and T.J. Gibson, CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, 1994. 22(22): p. 4673-4680.
21. Ye, J., et al., Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 2012. 13: p. 134.
22. Ruijter, J.M., et al., Efficiency Correction Is Required for Accurate Quantitative PCR Analysis and Reporting. *Clin Chem*, 2021. 67(6): p. 829-842.
23. Kempf M, Bakour S, Flaudrops C, Berrazeg M, Brunel JM, Drissi, M, Mesli, E, Touati, A, Rolain, J.M. Rapid detection of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *PLoSOne*, v.7:e31676, 2012.
24. Sauget M, Cabrol N, Manzoni M, Bertrand X1, Hocquet D. Rapid, sensitive and specific detection of OXA-48-like-producing Enterobacteriaceae by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Microbiological Methods*, 105:88-91, 2014.

Legenda das Figuras

- Figura – 1 Fluxograma do estudo.** O estudo foi realizado no Hospital Universitário, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará no período de 23/04/2019 a 29/05/2021. O total de 259 amostras foram coletadas para cultura e isolamento bacteriana. Em uma amostra não houve crescimento bacteriana resultando em 258 amostras com isolados bacterianas. Desse total foram isoladas 122 *K. pneumoniae*, 61 *A. baumannii*, 54 *P. aeruginosa*, e 21 outras bactérias. Uma amostra aleatória de 17-26% (14-21) das três mais frequentes bactérias gram-negativo foi utilizada para diagnósticos de 32 genes alvos de resistência bacteriana aos antimicrobianos através da técnica de qPCR em tempo real.
- Figura – 2 Origem e ocorrência de bactérias isoladas.** **A.** Mostra a origem dos sítios de amostras coletadas para o estudo. O sítio de aspirado traqueal foi o mais frequente, seguidos pelos swab retal, sangue e outros locais. **B.** Frequência dos principais isolados bacterianos, mostrando *K. pneumoniae* como o mais frequente isolado, seguido por *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *E. cloacae*, *K. aerogenes*, e outros bactérias.
- Figura - 3 Fenótipo de resistência bacteriana aos beta-lactâmicos.** **A.** Percentual de resistência a penicilinas e cefalosporinas. Notar o alto percentual em geral de resistência de bactérias gram-negativa aos beta-lactâmicos. **B.** Percentual de resistência bacteriana aos beta-lactâmicos combinados com os inibidores de beta-lactamases. Observar o alto percentual de resistência bacteriana, com exceção a combinação de ceftazidima mais avibactam. **C.** Observar o alto percentual de resistência bacteriana as carbapenemas, com exceção dos isolados de *E. coli*.
- Figura – 4 Fenótipo de resistência bacteriana aos aminoglicosídeos, quinolonas e outros antimicrobianos.** **A.** Notar o percentual acima de 30% de resistência bacteriana aos aminoglicosídeos e quinolonas. **B.** Os percentuais de multidroga (MDR), resistência estendida (XDR) e resistência as carbapenemas são elevados para maioria das cepas bacterianas de gram-negativo testadas.
- Figura - 5 Genótipos de resistência em isolados de bactérias gram-negativo associados com a síntese de beta-lactamases.** **A.** Observar que a maioria das cepas bacterianas apresentam a presença desses genes de resistência. **B.** Notar a heterogeneidade da presença de genes de resistência plasmidiais associados com a síntese de beta-lactamases de espectro estendido. **C.** Notar a relativa frequência presença de genes de síntese de beta-lactamases de espectro estendido em cepas de *A. baumannii*.
- Figura – 6 Genótipo de resistência em bactérias gram-negativo associados com a síntese de carbapenemases e acetiltransferase.** **A.** Observar a presença de gene de *KPC*, produtor de carbapenemase potente, em mais de 20% dos isolados de *A. baumannii*. **B.** *K. pneumoniae* apresenta um percentual elevado de *gene ACC(3')*, acetil-transferase associado com resistência ao aminoglicosídeos.
- Figura - 7 Genótipo de resistência em bactérias gram-negativo associados com a síntese de bombas de efluxos.** Notar a alta frequência, especialmente em cepas de *P. aeruginosa*, na presença dos genes associados com as bombas de efluxos.

Figura 1 - Fluxograma do Estudo

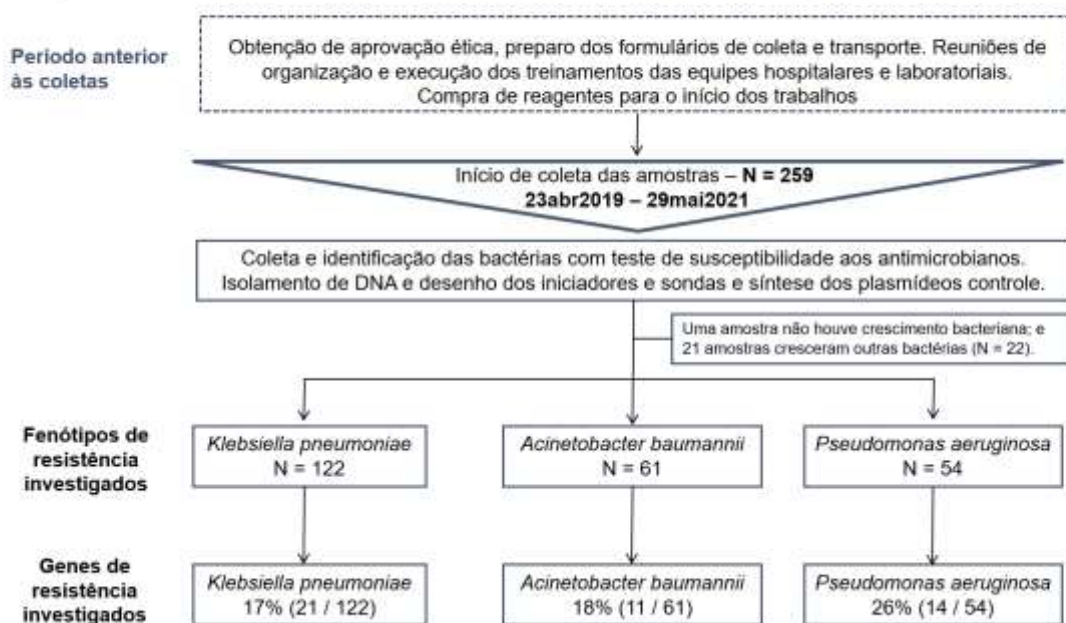


Figura 2 - Origem e ocorrência de organismos isolados da Unidade de Terapia Intensiva do Hospital Universitário. A: Origem dos organismos isolados; B: Ocorrência dos organismos isolados

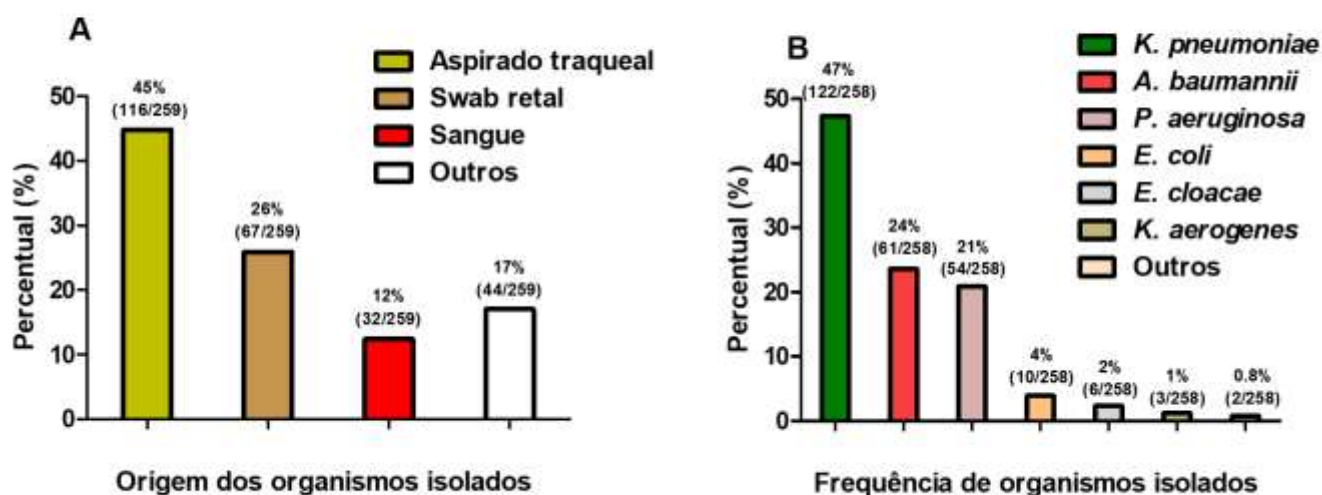


Figura 3 - Fenótipo de resistência aos beta-lactâmicos de isolados microbianos na Unidade de Terapia Intensiva – HUWC, UFC

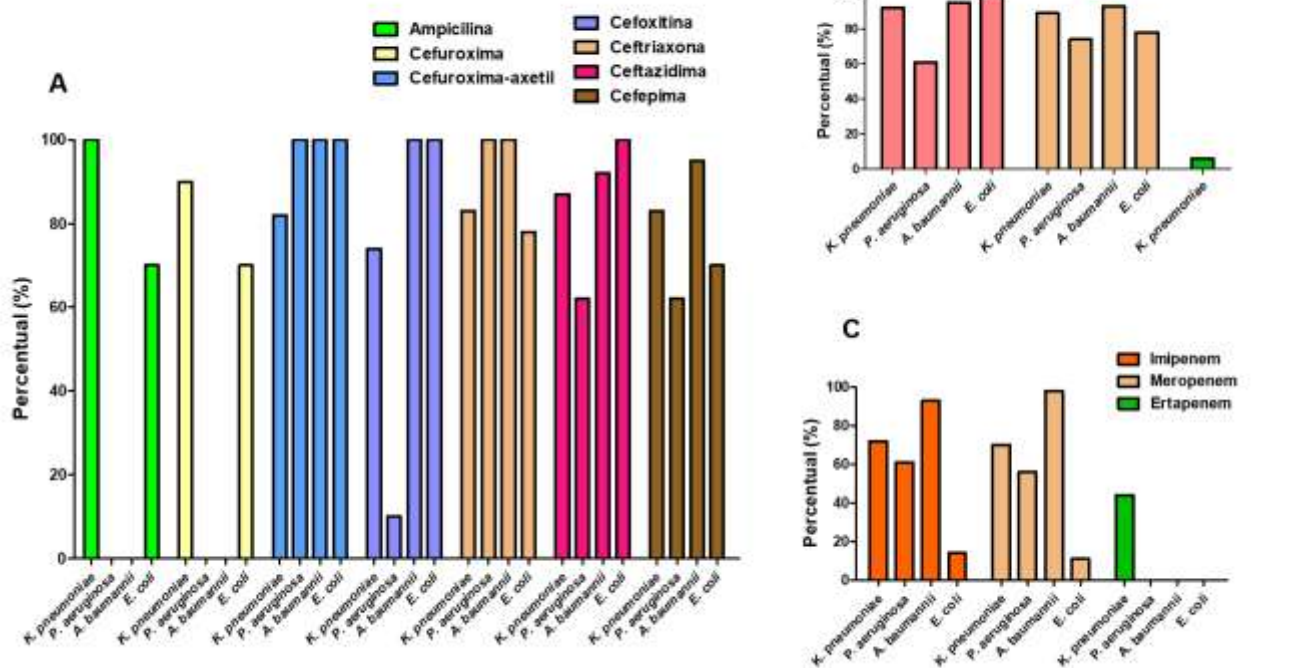
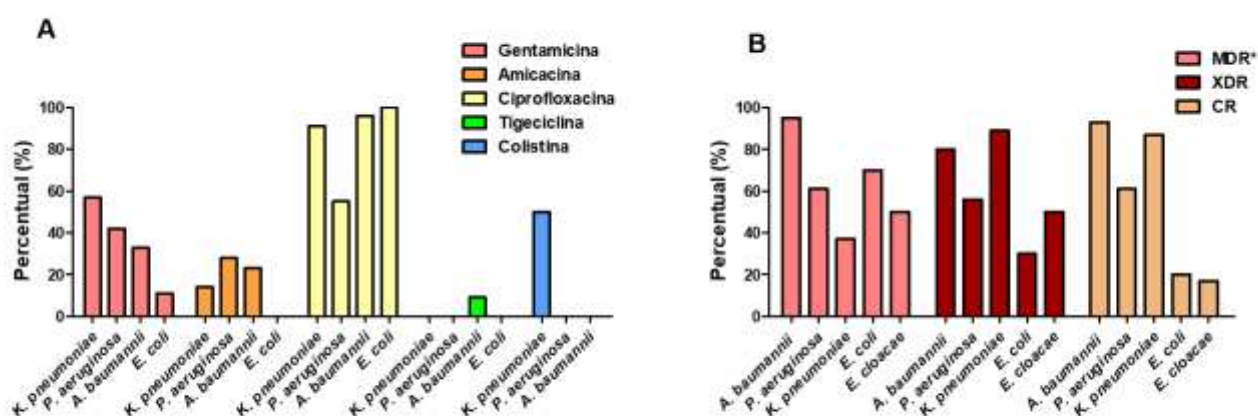


Figura 4 - Fenótipo de resistência aos aminoglicosídeos, quinolonas e outros antimicrobianos de isolados microbianos na Unidade de Terapia Intensiva – HUWC, UFC



* **MDR** = multidroga resistentes (resistência ≥ 1 agente em ≥ 3 classes de antimicrobianos); **XDR** = resistência estendida a drogas (susceptibilidade a ≤ 2 classes de antimicrobianos); e **CR** = Resistentes as carbapenemas.

Figura 5 - Genótipos de resistência associados com genes de beta-lactamases em isolados microbianos na Unidade de Terapia Intensiva – HUWC, UFC

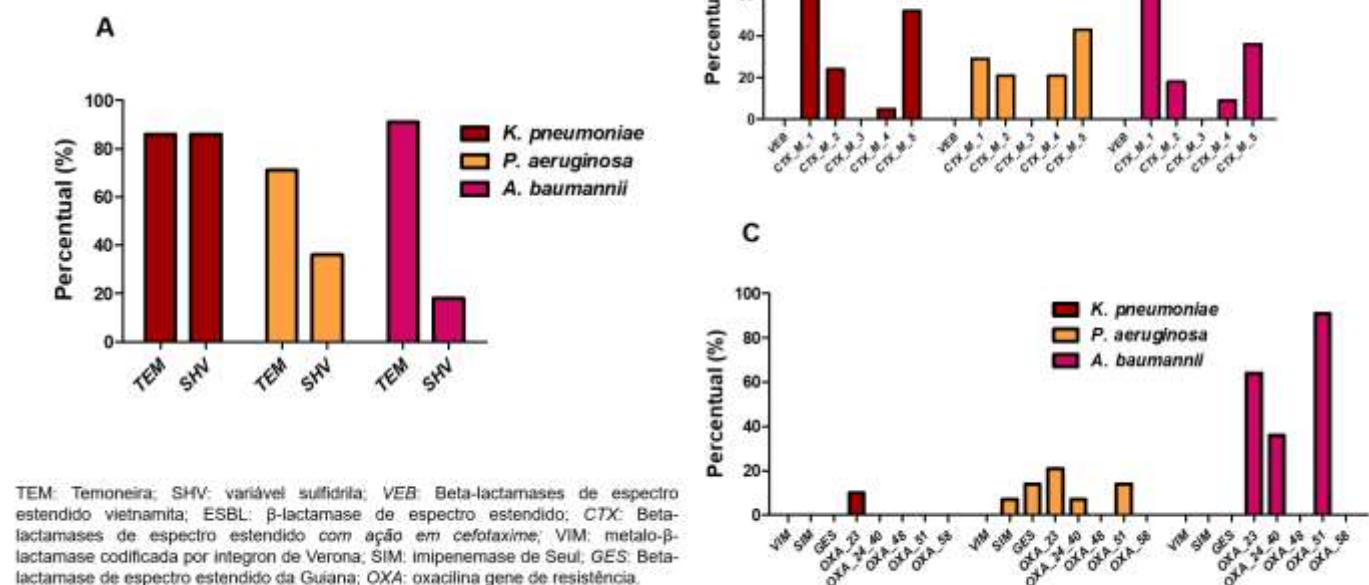
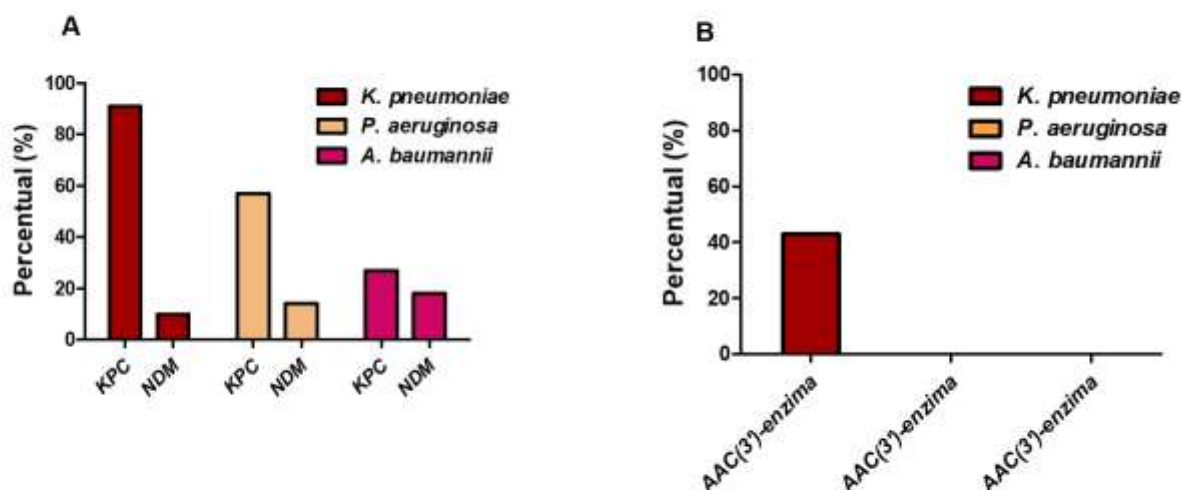
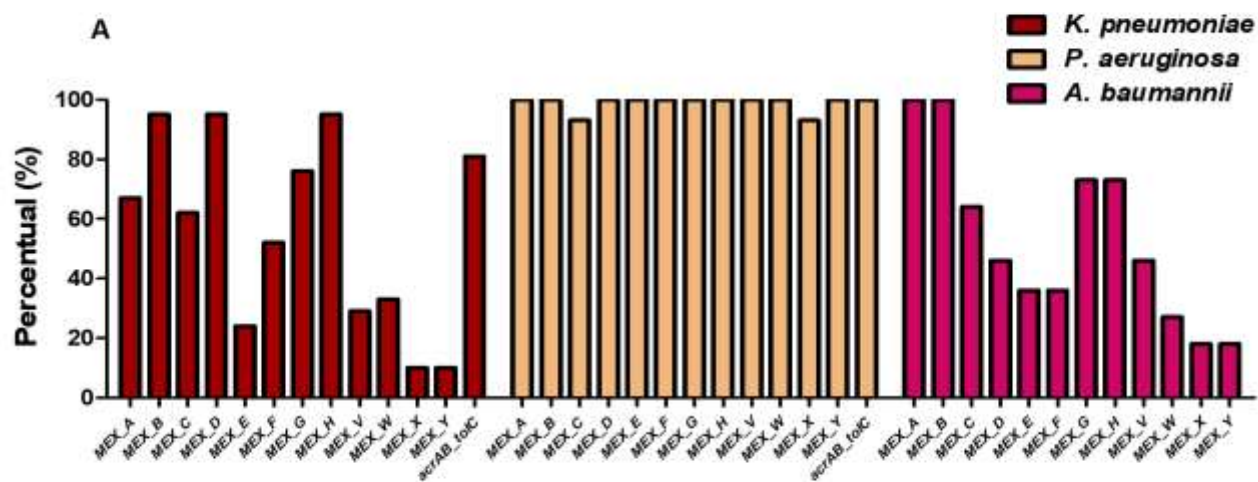


Figura 6 - Genótipos de resistência associados com genes de metalo-beta-lactamases e acetil-transferase em isolados microbianos na Unidade de Terapia Intensiva – HUWC, UFC



KPC: carbapenemase de *K. pneumoniae*; NDM: metalo-β-lactamase de Nova Deli. AAC(3): aminoglicosídeo acetiltransferase; MEX: mex-operon encode proteínas; *acrAB_tolC*: O sistema abrange a membrana celular (*AcrB*) e a membrana externa (*TolC*), e está ligado no periplasma por *AcrA*.

Figura 7 - Genótipos de resistência associados com genes de bombas de efluxo em isolados microbianos na Unidade de Terapia Intensiva – HUWC, UFC



MEX: mex-operon encode proteínas; *acrAB_tolC*: O sistema abrange a membrana celular (AcrB) e a membrana externa (TolC), e está ligado no periplasma por AcrA.

Tabela 1 - Primers para o diagnóstico das variantes de genes relacionados a resistência á antibióticos em bactérias gram-negativa.

Nº de acesso	Gene	Sequências identificáveis	Função	Primers	Sequência	Tamanho do produto (pb)	Ta (°C)
ARO:3000015	SHV	156	Produção de beta-lactamases	SHV F	ATTATCTCCCTGTTAGCCACCC	70	61
				SHV R	GTTTAATTTGCTCAAGCGGCTG		
ARO:3000021	VIM	39		VIM F	CCGTGATGGTGATGAGTTGC	133	X
				VIM R	GTCGTCATGAAAGTGCGTGG		
ARO:3004206	SIM	1		SIM F	TACAAGGGATTTCGGCATCGT	84	64
				SIM R	GGAAGCTGGAGTGTCGATGA		
ARO:3000059	KPC	19		KPC F	TCGCGGAACCATTCGCTAAA	128	61
				KPC R	GAATGAGCTGCACAGTGGGA		
ARO:3000057	NDM	27		NDM F	GAAGCTGAGCACCGCATTAG	86	64
				NDM R	CCATTTGCTGGCCAATCGTC		
ARO:3000014	TEM	167		TEM F	ACCCAGAAACGCTGGTGAAA	110	61
				TEM R	GGGGCGAAAACCTCTCAAGGA		
ARO:3000043	VEB	8		VEB F	TTCCATTTCCCGATGCAAAGC	122	X
				VEB R	GGCAAAAGGTCTTGAGGGGTA		

ARO:3000066	GES	25		GES F	GCCCAGGAGAGAGATTACGC	94	61
				GES R	CTTGACCGACAGAGGCAACT		
ARO:3000073	ACC	5		ACC F	TATCCGTGATTACCTGTCTGGC	118	63
				ACC R	TTATTCTTCTGCATCAGCGGC		
ARO:3000016	CTX-M 1	145		CTXM-1 F	GATTGCGGAAAAGCACGTCA	87	61
				CTXM-1 R	TTCATCGCCACGTTATCGCT		
	CTX-M 2			CTXM-2 F	CGCCGCTGATTCTGGTCA	90	61
				CTXM-2 R	TGACGATTTTAGCCGCCGAC		
	CTX-M 3			CTXM-3 F	CGTGGCTCAAAGGCAATACG	180	61
				CTXM-3 R	TCTGTTGCGGCTGGGTAAAA		
	CTX-M 4			CTXM-4 F	CGCTCAACACCGCGATCC	197	61
				CTXM-4 R	ATCCCCGACAACCCACGAT		
	CTX-M 5			CTXM-5 F	ATGGCGCAGACCCTGAAAAA	155	61
				CTXM-5 R	CTGCCGGTTTTATCGCCCA		
ARO:3000017	OXA-23	25		OXA-23 F	GCTCTAAGCCGCGCAAATAC	129	61
				OXA-23 R	TGACCTTTTCTCGCCCTTCC		
	OXA- 24 / 40	8		OXA-24/40 F	TGCCGATGACCTTGACATA	177	61
				OXA-24/40 R	CCATTAGCTTGCTCCACCCA		

	OXA- 48	17		OXA-48 F	CGGTAGCAAAGGAATGGCAAG	183	61
				OXA-48 R	GGGCGATCAAGCTATTGGGA		
	OXA- 51	153		OXA-51 F	GATCGGCCTTGAGCACCATA	199	61
				OXA-51 R	GCCATAACCAACACGCTTCA		
	OXA- 58	7		OXA-58 F	ATGGCACGCATTTAGACCGA	136	61
				OXA-58 R	AAACGTGGCTTTCCATCCCA		

Tabela 2 - Primers para o diagnóstico de bombas de efluxo genes relacionados a resistência á antibióticos em bactérias gram-negativa.

Bombas de Efluxo	GenBank	Gene	Função	Primers	Sequência	Tamanho do produto (pb)	Ta (°C)
MexAB-OprM	AE004091.2	MexA	Proteína de fusão da membrana	MexA F	GACAAGTGGCTGGTTACCGA	96	63
				MexA R	CACGGTCTTCACCTCGACAC		
	L11616.1	MexB	Transportador de membrana interna	MexB F	GTCGATTCCGTTCTCGGTGA	158	65
				MexB R	ACTCCACGATGAGAATGGCG		
MexCD-OprJ	U57969.1	MexC	Proteína de fusão da membrana	MexC F	CGTGCAATAGGAAGGATCGG	104	60
				MexC R	TCCACCGGCAACACCATT		
	U57969.1	MexD	Transportador de membrana interna	MexD F	TACACCCTGATCCCGTCCAT	170	64
				MexD R	ATGATCCGCTCGACGTTCTC		
MexEF-OprN	AE004091.2	MexE	Proteína de fusão da membrana	MexE F	CTGAGCTTCACCCGGATCAC	140	64
				MexE R	GCGTCGAAGTAGGCGTAGAC		
	AE004091.2	MexF	Transportador de membrana interna	MexF F	TCATCAAGGTCAGCGACACC	169	64
				MexF R	CACTCGTAGGTCATGCCGTT		
MexGHI-OpmD	AE004091.2	MexG	Proteína de membrana	MexG F	TGCAGCGCTTCATCGATAACT	120	64
				MexG R	GGCTGGCCTGATAGTCGAAC		
	AE004091.2	MexH	Proteína de fusão da membrana	MexH F	TCATCAAGGTCAGCGACACC	124	65

				MexH R	CACTCGTAGGTCATGCCGTT		
MexVW-OprM	AE004091.2	MexV	Proteína de fusão da membrana	MexV F	TACTGTTCTTTCCGGCGAC	170	61
				MexV R	TTCGCTTTTCGAGATGGCCT		
	NC_002516.2	MexW	Proteína de membrana	MexW F	CCTCGGTCTACATCGGCATC	181	65
				MexW R	CCGAGGGTCTTCACCACTTC		
MexXY-OprM	AB015853.1	MexX	Proteína de membrana	MexX F	TGCTGTTCCAGATCGACCCT	127	60
				MexX R	TCCTTGATCAGGTCGGCGTA		
	AB015853.1	MexY	Proteína de fusão da membrana	MexY F	GTCAACCAAATGACCGCCAC	134	65
				MexY R	ATGTTGTAGCTCACGCCCTC		
AcrAB-tolC	AP018753.1	AcrAB-tolC	Sistema tripartido com membrana celular (AcrB), membrana externa(tolC) ligado pelo periplasma (acrA)	AcrAB-tolC F	GGTAGAGAACGTCGAGCGAG	143	60
				AcrAB-tolC R	CGAAGAACGCCATCGGGATA		

Ta = Temperatura de anelamento do primer

Pb = pares de bases; Primer F = Forward; Primer R = Reverse

Tabela 3 - Controles positivos dos genes relacionados a resistência á antibióticos em bactérias gram-negativa.

Genes	Amostra controle	Sexo	Idade (anos)	Material	Isolado
SHV	RES-144	M	75	Swab Retal	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
GES	RES-111	M	61	Lavado broncoalveolar	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
TEM	RES-092	M	74	Sangue	<i>Acinetobacter baumannii</i>
KPC	RES-141	M	66	Swab Retal	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
NDM	RES-167	F	60	Sangue	<i>Acinetobacter baumannii</i>
OXA-23	RES-021	M	79	Aspirado Traqueal	<i>Acinetobacter baumannii</i>
OXA-24/40	RES-092	M	74	Sangue	<i>Acinetobacter baumannii</i>
OXA-51	RES-161	M	55	Coxa Esquerda	<i>Acinetobacter baumannii</i>
CTXM-1	RES-048	M	80	Aspirado Traqueal	<i>Acinetobacter baumannii</i>
CTXM-2	RES-167	F	60	Sangue	<i>Acinetobacter baumannii</i>
CTXM-3	RES-096	F	41	Aspirado traqueal	<i>Acinetobacter baumannii</i>
CTXM-4	RES-159	F	73	Swab Retal	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
CTXM-5	RES-086	F	61	Aspirado Traqueal	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
MEX	RES-010	M	60	Fragmento Tecido	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
acrAB-toIC	RES-150	M	79	Sangue	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

M – Masculino; F - Feminino

Tabela 4 - Fenótipo de resistência aos beta-lactâmicos de isolados microbianos dos sites de infecções na Unidade de Terapia intensiva – HUWC, UFC.

Beta-lactâmicos - % (N/Total)										
Bactérias Gram-negativa	Penicilina	Cafalosporinas						Carbapenemas		
		2ª. geração			3ª. geração		4ª. geração			
	Ampicilina	Cefuroxima	Cefuroxima	Cefoxitina	Ceftriaxona	Ceftazidima	Cefepima	Imipenem	Meropenem	Ertapenem
<i>K. pneumoniae</i>	100 (53/53)	90 (47/52)	82 (18/22)	74 (14/19)	83 (44/53)	87 (45/52)	83 (44/53)	72 (38/53)	70 (37/53)	44 (11/25)
<i>A. baumannii</i>	-	-	100 (24/24)	100 (25/25)	100 (23/23)	92 (22/24)	95 (58/61)	93 (57/61)	98 (39/40)	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	100 (32/32)	100 (32/32)	100 (25/25)	62 (33/52)	62 (33/52)	61 (30/49)	56 (27/48)	-
<i>E. coli</i>	70 (7/9)	70 (7/9)	100 (4/4)	100 (3/3)	78 (7/9)	100 (6/6)	70 (7/9)	14 (1/7)	11 (1/9)	0 (0/8)

Tabela 5 - Fenótipo de resistência aos beta-lactâmicos mais inibidores de beta-lactamases de isolados microbianos dos sites de infecções na Unidade de Terapia Intensiva – HUWC, UFC.

Bactérias Gram-negativa	Penicilinas + inibidores de beta-lactamases		Cefalosporina + inibidor de beta-lactamase
	Ampicilina + sulbactam % (N/Total)	Piperacilina + tazobactam % (N/Total)	Ceftazidima + avibactam % (N/Total)
<i>K. pneumoniae</i>	92 (46/50)	89 (46/52)	6 (1/16)
<i>A. baumannii</i>	95 (57/60)	93 (39/42)	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	74 (32/43)	-
<i>E. coli</i>	100 (7/7)	78 (7/9)	-

E. coli: 75% (6/8) e *K. pneumoniae*: 12% (6/52) foram positivos para o teste de beta-lactamase de espectro estendido.

Tabela 6 - Fenótipo de resistência aos aminoglicosídeos, quinolonas e outros antimicrobianos de isolados microbianos dos sites de infecções na Unidade de Terapia Intensiva – HUWC, UFC.

Bactérias Gram-negativa	Aminoglicosídeos % (N/Total)		Quinolonas % (N/Total)	Outros % (N/Total)	
	Gentamicina	Amicacina	Ciprofloxacina	Tigeciclina	Colistina
<i>K. pneumoniae</i>	57 (28/49)	14 (7/52)	91 (48/53)	0 (0/13)	50 (3/6)
<i>A. baumannii</i>	33 (19/57)	23 (10/43)	96 (44/46)	9 (5/54)	0 (0/15)
<i>P. aeruginosa</i>	42 (22/53)	28 (15/53)	55 (28/51)	0 (0/32)	0 (0/11)
<i>E. coli</i>	11 (1/9)	0 (0/9)	100 (9/9)	0 (0/6)	-

TM / SMZ: trimetoprim + sulfametoxazol.

Tabela 7 - Frequência de fenótipos de multirresistentes, extensivamente resistentes e fenótipo de bactérias gram-negativo resistentes a carbapenêmicos entre isolados da Unidade de Terapia Intensiva do Hospital Universitário.

Organismo	MDR* % (N/Total)	XDR % (N/Total)	CR % (N/Total)
<i>A. baumannii</i>	95 (58/61)	80 (49/61)	93 (57/61)
<i>P. aeruginosa</i>	61 (33/54)	56 (30/54)	61 (33/54)
<i>Enterobacterales</i>			
<i>K. pneumoniae</i>	37 (45/122)	89 (108/122)	87 (106/122)
<i>E. coli</i>	70 (7/10)	30 (3/10)	20 (2/10)
<i>E. cloacae</i>	50 (3/6)	50 (3/6)	17 (1/6)

* MDR = multidroga resistentes (resistência ≥ 1 agente em ≥ 3 classes de antimicrobianos); XDR = resistência estendida a drogas (susceptibilidade a ≤ 2 classes de antimicrobianos; e CR = Resistentes a carbapenemas.

Tabela 8 - Genes de beta-lactamases associados com resistência aos beta-lactâmicos em bactérias gram-negativo: *K. pneumoniae*, *A. baumannii* e *P. aeruginosa* isoladas do Hospital Universitário da Universidade Federal do Ceará.

Genes de resistência	<i>Klebsiellapneumoniae</i> % (N/Total)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> % (N/Total)	<i>Acinetobacter baumannii</i> % (N/Total)
Beta-lactamasepenicilinase			
<i>TEM</i>	86 (18/21)	71 (10/14)	91 (10/11)
<i>SHV</i>	86 (18/21)	36 (5/14)	18 (2/11)
Beta-lactamaseplasmidial			
<i>VEB</i>	0 (0/21)	0 (0/14)	0 (0/11)
<i>CTX_M_1</i>	67 (14/21)	29 (4/14)	73 (8/11)
<i>CTX_M_2</i>	24 (5/21)	21 (3/14)	18 (2/11)
<i>CTX_M_3</i>	0 (0/21)	0 (0/14)	0 (0/11)
<i>CTX_M_4</i>	5 (1/21)	21 (3/14)	9 (1/11)
<i>CTX_M_5</i>	52 (11/21)	43 (6/14)	36 (4/11)
Beta-lactamase de espectro estendido - ESBL			
	0 (0/21)	0 (0/14)	0 (0/11)
<i>VIM</i>	0 (0/21)	7 (1/14)	0 (0/11)
<i>SIM</i>	0 (0/21)	14 (2/14)	0 (0/11)
<i>GES</i>	10 (2/21)	21 (3/14)	64 (7/11)
<i>OXA_23</i>	0 (0/21)	7 (1/14)	36 (4/11)
<i>OXA_24_40</i>	0 (0/21)	0 (0/14)	0 (0/11)
<i>OXA_48</i>	0 (0/21)	14 (2/14)	91 (10/11)
<i>OXA_51</i>	0 (0/21)	0 (0/14)	0 (0/11)
<i>OXA_58</i>			

Serina-carbapenemase - <i>KPC</i>	91 (19/21)	57 (8/14)	27 (3/11)
Metalo-carbapenemase - <i>NDM</i>	10 (2/21)	14 (2/14)	18 (2/11)

TEM: Temoneira; SHV: variável sulfidril; VEB: Beta-lactamases de espectro estendido vietnamita; ESBL: β -lactamase de espectro estendido; CTX: Beta-lactamases de espectro estendido com ação em cefotaxime; VIM: metalo- β -lactamase codificada por integron de Verona; SIM: imipenemase de Seul; GES: Beta-lactamase de espectro estendido da Guiana; OXA: oxacilina gene de resistência; KPC: carbapenemase de *K. pneumoniae*; NDM-1: metalo- β -lactamase de Nova Deli.

Tabela 9 - Genes de resistência aos antimicrobianos associados com bactérias gram-negativo: *K. pneumoniae*, *A. baumannii* e *P. aeruginosa* isoladas do Hospital Universitário da Universidade Federal do Ceará.

Genes de resistência	<i>Klebsiellapneumoniae</i> % (N/Total)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> % (N/Total)	<i>Acinetobacter baumannii</i> % (N/Total)
AAC(3')-Acetiltransferase	43 (9/21)	0 (0/14)	0 (0/11)
Bombas de efluxo			
<i>MEX_A</i>	67 (14/21)	100 (14/14)	100 (11/11)
<i>MEX_B</i>	95 (20/21)	100 (14/14)	100 (11/11)
<i>MEX_C</i>	62 (13/21)	93 (13/14)	64 (7/11)
<i>MEX_D</i>	95 (20/21)	100 (14/14)	46 (5/11)
<i>MEX_E</i>	24 (5/21)	100 (14/14)	36 (4/11)
<i>MEX_F</i>	52 (11/21)	100 (14/14)	36 (4/11)
<i>MEX_G</i>	76 (16/21)	100 (14/14)	73 (8/11)
<i>MEX_H</i>	95 (20/21)	100 (14/14)	73 (8/11)
<i>MEX_V</i>	29 (6/21)	100 (14/14)	46 (5/11)
<i>MEX_W</i>	33 (7/21)	93 (13/14)	27 (3/11)
<i>MEX_X</i>	10 (2/21)	100 (14/14)	18 (2/11)
<i>MEX_Y</i>	10 (2/21)	100 (14/14)	18 (2/11)
<i>acrAB_toIC</i>	81 (17/21)	-	-

AAC(3'): aminoglicosídeo acetiltransferase; *MEX*: mex-operon encode proteínas; *acrAB_toIC*: O sistema abrange a membrana celular (AcrB) e a membrana externa (TolC), e está ligado no periplasma por AcrA.

Tabela 10 – Associações significativas entre os fenótipos e genes de resistência as classes de antimicrobianos nas cepas de bactérias gram-negativo isolados na Unidade de Terapia Intensiva no Hospital Universitário da Universidade Federal do Ceará.

Classes de antimicrobianos N/Total (%)	Gene bomba de efluxo: <i>acrAB_tolC</i> N/Total (%)		Gene <i>ACC(3')</i> – acetil-transferase N/Total (%)	
	Positivo *	Negativo	Positivo	Negativo
Cefalosporinas (ceftriaxona)				
Sensível	0/7 (0) ^a	2/11 (15) ^b	-	-
Resistente	6/7 (86) ^a	0/15 (0) ^b		
Carbapenemas (imipenema)				
Sensível	0/7 (0) ^a	2/2 (100) ^b	-	-
Resistente	6/7 (86) ^a	0/2 (0) ^b		
Quinolonas (ciprofloxacina)				
Sensível	0/7 (0) ^a	2/2 (100) ^b	-	-
Resistente	6/7 (86) ^a	0/2 (0) ^b		
Aminoglicosídeos (gentamicina)				
Sensível	0/7 (0) ^a	2/2 (100) ^b	0/2 (0) ^a	20/29 (69) ^b
Resistente	6/7 (86) ^a	0/2 (0) ^b	2/2 (100) ^a	9/29 (31) ^b

* Letras diferentes no sobrescrito denota um subconjunto de categorias cujas proporções de coluna diferem significativamente umas das outras no nível 0,05. Teste estatístico utilizado: Teste Qui-Quadrado da Razão de Verossimilhança.

Tabela 11 – Associações significativas entre os fenótipos MDR, XDR e genes de resistência as classes de antimicrobianos nas cepas de bactérias gram-negativo dos isolados na Unidade de Terapia Intensiva no Hospital Universitário da Universidade Federal do Ceará.

Fenótipo de resistência aos antimicrobianos N/Total (%)	Gene CTX <i>M 5</i> N/Total (%)		Gene OXA <i>24 40</i> N/Total (%)		Gene OXA <i>51</i> N/Total (%)		Gene MEX- <i>V</i> N/Total (%)		Gene ACC(3') – acetil-transferase N/Total (%)	
	Positivo *	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
MDR ** Sensível Resistente	13/21 (62) ^a 8/21 (38) ^a	6/25 (24) ^b 19/25 (76) ^b	0/5 (0) ^a 5/5 (100) ^a	19/41 (46) ^b 22/41 (54) ^b	1/12 (8) ^a 11/12 (92) ^a	18/34 (53) ^b 16/34 (47) ^b	7/25 (28) ^a 18/25 (72) ^a	12/21 (57) ^b 9/21 (43) ^b	-	-
XDR Sensível Resistente	-	-	-	-	-	-	-	-	0/9 (0) ^a 9/9 (100) ^a	12/37 (32) ^b 25/37 (68) ^b

* Letras diferentes no sobrescrito denota um subconjunto de categorias cujas proporções de coluna diferem significativamente umas das outras no nível 0,05. Teste estatístico utilizado: Teste Qui-Quadrado da Razão de Verossimilhança.

** MDR = multidroga resistentes (resistência ≥1 agente em ≥3 classes de antimicrobianos); XDR = resistência estendida a drogas (susceptibilidade a ≤2 classes de antimicrobianos; e CR = Resistentes a carbapenemas.