



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Arthur Mousinho de Andrade Veríssimo

**Identificação Molecular de Espécie em Isolados de *Acinetobacter* sp. e
Pseudomonas sp. de Origem Hospitalar**

MOSSORÓ

2024

Arthur Mousinho de Andrade Veríssimo

**Identificação Molecular de Espécie em Isolados de *Acinetobacter* sp. e
Pseudomonas sp. de Origem Hospitalar**

Monografia apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Caio Augusto Martins Aires

MOSSORÓ

2024

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

V516i Veríssimo, Arthur Mousinho de Andrade.
Identificação molecular de espécie em isolados
de Acinetobacter sp. e Pseudomonas sp. de origem
hospitalar / Arthur Mousinho de Andrade Veríssimo.
- 2024.
54 f. : il.

Orientador: Caio Augusto Martins Aires.
Monografia (graduação) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Curso de Biotecnologia,
2024.

1. amplificação de genes. 2. IRAS. 3.
identificação bacteriana. I. Aires, Caio Augusto
Martins, orient. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada por sistema gerador automático em conformidade
com AACR2 e os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Biblioteca Campus Mossoró / Setor de Informação e Referência
Bibliotecária: Keina Cristina Santos Sousa e Silva
CRB: 15/120

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

Arthur Mousinho de Andrade Veríssimo

**Identificação Molecular de Espécie em Isolados de *Acinetobacter* sp. e
Pseudomonas sp. de Origem Hospitalar**

Monografia apresentada à Universidade
Federal Rural do Semi-Árido como requisito
para obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia.

Defendida em: ____ / ____ / ____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Caio Augusto Martins Aires (UFERSA)
Presidente

Me. Monica Ellen da Costa Soares (UFERSA)
Membro Examinador

Prof. Dr. Thiago Pavoni Gomes Chagas (UFF)
Membro Examinador

Discente

DEDICATÓRIA

*Dedico à minha família, por cada sacrifício
que tornou possível o meu caminho até a Biotecnologia.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, que me ensinou a me desafiar e a alcançar as minhas metas, e por não poupar esforços para que eu as alcançasse, sendo meu ponto de apoio e segurança durante os desafios enfrentados.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Caio Augusto Martins Aires, por todo conhecimento repassado e orientação, bem como pelo apoio, paciência e compreensão durante a confecção deste trabalho. Servindo de exemplo de dedicação e esforço na sua área de atuação profissional e pessoal.

Agradeço a equipe do Laboratório de Microbiologia Clínica da UFERSA por todo auxílio fornecido para que esse trabalho fosse concluído e por todos os momentos vivenciados em laboratório que contribuíram para minha formação profissional e pessoal.

Agradeço à Docente, Profa. Dra. Ana Carla Diógenes Suassuna Bezerra, por ter sido a primeira a abrir as portas de seu laboratório e me apresentar o mundo da pesquisa e desenvolvimento científico.

Agradeço a Banca Examinadora pela disponibilidade em avaliar este trabalho, bem como pelas contribuições a ele dadas.

Agradeço aos meus amigos que dividiram comigo o peso dos desafios e da jornada no curso de Bacharelado em Biotecnologia, tornando essa trajetória mais leve com momentos inesquecíveis.

EPÍGRAFE

“A Biotecnologia surge para resolver
problemas reais de pessoas reais.”

Alexsandra Pereira

RESUMO

A identificação bioquímica das espécies amplamente utilizadas na rotina laboratorial pode apresentar falhas, resultando na identificação com baixa precisão. Assim, métodos baseados na amplificação de ácidos nucleicos, vêm sendo desenvolvidas e aplicadas com intuito de garantir uma identificação mais eficiente e precisa. Nesse contexto, o presente trabalho tem por objetivo diferenciar as espécies *A. baumannii* e *P. aeruginosa* dentre outros isolados de origem hospitalar a partir da seleção dos isolados bacterianos, realização da PCR de identificação e, por fim, diferenciação das espécies nos isolados. Para tal, foram utilizados isolados bacterianos de origem hospitalar previamente identificados como *Acinetobacter* sp. e *P. aeruginosa* por testes bioquímicos no hospital de origem. Posteriormente, o DNA de cada isolado bacteriano foi extraído para a utilização na identificação por PCR. Como resultado, foi observado a maior frequência de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* entre os 80 isolados analisados, majoritariamente pertencentes a UTI e provenientes de amostras de secreção traqueal, urina e sangue. As PCRs de identificação das espécies apresentaram boa capacidade de diferenciação das espécies entre os isolados bacterianos e maior exatidão quando comparados ao método bioquímico. O presente estudo apresenta uma metodologia mais exata, podendo vir a auxiliar no diagnóstico e promover um maior controle das IRAS. Resultando em uma maior segurança ao paciente, bem como na redução da ocorrência das infecções em ambientes de assistência à saúde.

Palavras-chave: amplificação de genes; IRAS; identificação bacteriana.

ABSTRACT

Biochemical identification of species widely used in laboratory routine may present errors, resulting in low-precision identification. Therefore, methods based on nucleic acid amplification have been developed and applied in order to ensure more efficient and accurate identification. In this context, the present study aims to differentiate the species *A. baumannii* and *P. aeruginosa* among other isolates of hospital origin by selecting bacterial isolates, performing PCR for identification and, finally, differentiating the species in the isolates. For this purpose, bacterial isolates of hospital origin previously identified as *Acinetobacter* sp. and *P. aeruginosa* by biochemical tests in the hospital of origin were used. Subsequently, the DNA of each bacterial isolate was extracted for use in PCR identification. As a result, the highest frequency of *A. baumannii* and *P. aeruginosa* was observed among the 80 isolates analyzed, mostly belonging to the ICU and coming from samples of tracheal secretion, urine and blood. The PCRs for species identification showed good capacity for species differentiation among bacterial isolates and greater accuracy when compared to the biochemical method. The present study presents a more accurate methodology, which may aid in the diagnosis and promote greater control of HAIs, resulting in greater patient safety, as well as a reduction in the occurrence of infections in healthcare settings.

Keywords: gene amplification; HAIs; bacterial identification.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Comparação entre o método bioquímico e o baseado em amplificação de ácidos nucléicos por PCR.....	22
Figura 2 – Representação dos ciclos da PCR e amplificação exponencial da sequência-alvo.....	26
Figura 3 – Gel de agarose 1,5% com os amplicons de PCR Multiplex e uniplex dos genes <i>recA</i> , região ITS e <i>bla</i> _{OXA-51-like} , respectivamente, em gel de agarose.....	35
Figura 4 – Gel de agarose 1,5% com os amplicons de PCR uniplex do gene 16S rDNA em gel de agarose para identificação espécie-específica dos isolados de <i>Pseudomonas</i> sp.....	36

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	– Frequência de <i>A. baumannii</i> nos isolados bacterianos de origem hospitalar identificados pela técnica de PCR Multiplex.....	37
Gráfico 2	– Frequência de <i>P. aeruginosa</i> nos isolados bacterianos de origem hospitalar identificados pelas técnicas de PCR uniplex.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Alguns métodos de identificação bacteriana utilizados e suas principais características.....	23
Tabela 2	– Oligonucleotídeos utilizados para a padronização de identificação de <i>A. baumannii</i> e <i>P. aeruginosa</i> por PCR.	31
Tabela 3	– Interpretação dos resultados da PCR para identificação de <i>Acinetobacter</i> sp. e <i>Pseudomonas</i> sp.	33
Tabela 4	– Caracterização dos isolados bacterianos de origem hospitalar utilizados para padronização da identificação baseada em PCR.....	34
Tabela 5	– Comparação entre a identificação bioquímica e molecular baseada em PCR realizada nos isolados bacterianos de origem hospitalar estudados.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHI	<i>Brain and Heart Infusion</i>
CAB	Complexo <i>Acinetobacter calcoaceticus-baumannii</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos
CM	Clínica Médica
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
Dr	Doutor
ESKAPE	<i>Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, A. baumannii, P. aeruginosa e Enterobacter spp.</i>
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
LABMIC	Laboratório de Microbiologia Clínica
mA	Miliampères
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight</i>
Me	Mestre
OMS	Organização Mundial da Saúde
pb	Pares de Bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PNPCIRAS	Programa Nacional de Prevenção e Controle de Infecções Relacionadas à Saúde
PSM	Pronto Socorro Masculino
R\$	Real
RN	Rio Grande do Norte
RNA	Ácido Ribonucleico

rpm	Rotações por Minuto
rRNA	Ácido Ribonucléico Ribossômico
sp.	Espécie
spp.	Espécies
US\$	Dólar
UFERSA	Universidade Federal Rural do Semi-Árido
UPI	Unidade de Paciente Infectado
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UV	Radiação Ultravioleta
WGS	<i>Whole Genome Sequencing</i> - Sequenciamento do Genoma Completo

LISTA DE SÍMBOLOS

@	Arroba
©	Copyright
°C	Grau Celsius
®	Marca registrada
%	Porcentagem
\$	Cifrão
µL	Microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1 Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde - IRAS	17
2.2 Gênero <i>Acinetobacter</i> e <i>Acinetobacter baumannii</i>	18
2.3 Gênero <i>Pseudomonas</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
2.4 Métodos de Identificação Bacteriana	20
2.4.1 Reação em Cadeia da Polimerase - PCR	25
2.4.2 Identificação de <i>Acinetobacter</i>	27
2.4.3 Identificação de <i>Pseudomonas</i>	28
3. JUSTIFICATIVA	29
4. OBJETIVOS	30
4.1 Objetivo Geral	30
4.2 Objetivos Específicos	30
5. MATERIAL E MÉTODOS	31
5.1 Caracterização dos isolados bacterianos	31
5.2. Extração de DNA e detecção das espécies bacterianas	31
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

A identificação de microrganismos é essencial para diversas áreas, incluindo a microbiologia clínica (Franco-Duarte *et al.*, 2019). Uma das atuações do laboratório de microbiologia consiste em garantir uma identificação rápida e precisa de microrganismos patogênicos, possibilitando ao microbiologista a aplicação apropriada do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos a fim de garantir uma melhor interpretação dos resultados de acordo com os pontos de corte estabelecidos pelas instituições regulatórias (Koneman *et al.*, 2017; Sánchez *et al.*, 2015).

Com isso, a identificação dos isolados clínicos compreende o primeiro passo para possibilitar aos clínicos a compreensão da etiologia das infecções, auxiliando na determinação da melhor terapêutica a ser aplicada (Koneman *et al.*, 2017). Para tal, a determinação de uma técnica apropriada é essencial para uma identificação precisa (Franco-Duarte *et al.*, 2019).

A identificação bacteriana consiste na utilização de técnicas baseadas no fenótipo e no genótipo, onde a genotípica se apresenta como melhor alternativa para determinação da identidade e compreensão epidemiológica bacteriana (Bou *et al.*, 2011). As técnicas baseadas no fenótipo representam as mais amplamente utilizadas, porém o tempo requerido para identificação de microrganismos com abordagens tradicionais, como morfologia e bioquímica, leva de dois a cinco dias (Sánchez *et al.*, 2015). Além do longo período necessário, essas abordagens nem sempre garantem uma correta identificação a nível de espécie (Bochner, 2008).

Grande parte dos laboratórios de microbiologia clínica atualmente contam com a utilização de sistemas comerciais semi-automáticos ou automatizados para realizar a identificação por caracterização bioquímica (Sánchez *et al.*, 2015). Sistemas como o Vitek® são normalmente utilizados, apesar das limitações dos métodos fenotípicos, devido a fornecer uma identificação inicial a baixo custo e possuir pessoal habilitado na metodologia (Georghiou *et al.*, 1995).

Os métodos moleculares baseados na amplificação de ácidos nucleicos surgem como alternativa para garantir uma identificação mais exata (Chang *et al.*, 2021). Nesse contexto, a PCR ou sistemas baseados em PCR podem ser utilizados cada vez mais para identificar e avaliar a frequência das espécies bacterianas em ambientes hospitalares, incluindo *Acinetobacter* sp. e *Pseudomonas* sp. (Cason *et al.*, 2022).

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde - IRAS

O termo IRAS vem sendo utilizado em substituição ao termo “Infecções Hospitalares” (Leal; Freitas-Vilela, 2021), sendo àquelas infecções obtidas em decorrência da assistência à saúde no período no qual o indivíduo permaneceu internado ou realizou procedimentos invasivos, seja em hospital ou outros locais de assistência como clínicas ambulatoriais, centros de reabilitação e *homecare* (ANVISA, 2021). Estando geralmente associado com a utilização de dispositivos invasivos, realização de operações cirúrgicas e microrganismos resistentes aos antimicrobianos (Leal; Freitas-Vilela, 2021). As IRASs compreendem uma problemática mundial, pois promovem o aumento da mortalidade, aumento do tempo de internação e aumento dos custos da assistência (Alvim *et. al*, 2019).

De acordo com Storr *et. al* (2017), os custos médicos em hospitais nos Estados Unidos da América relacionados às IRASs correspondem a uma faixa de U\$35,7 a U\$45 bilhões por ano. Em comparação, a Europa apresenta um custo anual de aproximadamente € 7 bilhões. Ambos representam um impacto econômico significativo. Todavia, apesar do impacto econômico gerado pelas IRAS, estas podem ser evitadas em grande parte através de medidas que visem a prevenção e controle de infecções nos serviços de saúde (ANVISA, 2021).

No Brasil, uma pesquisa desenvolvida por Oliveira *et. al* (2024) com o objetivo de estimar o impacto financeiro de um projeto de prevenção das IRAS em instituições das cinco regiões brasileiras demonstrou que o custo médio para infecções na corrente sanguínea, pneumonia associada ao equipamento de ventilação e infecções do trato urinário associado ao cateter correspondem a aproximadamente a R\$ 44.944,00, R\$ 53.206,70 e R\$ 39.759,20, respectivamente. Em consonância, outro estudo relatou que o custo médio diário de um paciente com IRAS é 55% superior quando comparado a um paciente sem IRAS (Kiffer *et al.*, 2015).

Estas infecções são ocasionadas geralmente por microrganismos multirresistentes aos antimicrobianos (geralmente bactérias) que promovem o aumento de custo de atendimento devido a necessidade de um maior tempo de permanência no ambiente hospitalar para administração de antimicrobianos de última geração (Leoncio *et.al*, 2019). A resistência aos antibióticos vem sendo considerada um problema de saúde pública, onde a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que cerca de 50 milhões de mortes por ano serão provocadas por infecções associadas à resistência aos antimicrobianos (Zhen *et. al*, 2019; Giono-Cerezo *et. al*, 2020).

Diante disso, a OMS estabeleceu uma lista de microrganismos prioritários para pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos, dentre estes, o grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* e *Enterobacter* spp.) se destaca por ser composto por microrganismos caracterizados por sua alta capacidade de resistência intrínseca e adquirida aos antimicrobianos (De Oliveira *et. al*, 2020). Assim também, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), destaca dentre os microrganismos prioritários nos serviços de saúde, a *Acinetobacter* sp. e *P. aeruginosa*, categorizados como ameaça urgente e séria ameaça a saúde pública, respectivamente, devido ao aumento no número de cepas resistentes a antibióticos (Valcek *et. al*, 2022).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), órgão responsável pelo controle e prevenção de IRAS, desenvolveu o Programa Nacional de Prevenção e Controle de Infecções Relacionadas à Saúde (PNPCIRAS) com o objetivo de elaborar diretrizes, normas e medidas para o controle das IRAS. Diante disso, o PNPCIRAS vigente durante o período de 2021 a 2025 apresenta como um de suas finalidades o controle dos microrganismos multirresistentes tidos como prioritários nos serviços de saúde (ANVISA, 2021), como *A. baumannii* e *P. aeruginosa*.

2.2. Gênero *Acinetobacter* e *Acinetobacter baumannii*

O gênero *Acinetobacter* compreende nas bactérias caracterizadas por serem Gram-negativas de formato cocobacilar, aeróbicas, não fermentadoras de carboidratos, de fácil cultivo, sem motilidade, catalase positiva, oxidase negativa e com o conteúdo de guanina e citosina entre 39 a 42% (Peleg; Seifert; Paterson, 2008). Sendo a obtenção do primeiro isolado bacteriano do gênero realizado pelo microbiologista holandês Beijerinck no ano de 1911, a partir do solo e meio de cultura simples enriquecido com acetato de cálcio (Howard *et al.*, 2012).

Com mais de 77 espécies registradas (Migliaccio *et al.*, 2023), o gênero apresenta algumas espécies de interesse clínico, por estarem associadas às IRASs, como *A. baumannii*, *A. pittii* e *A. nosocomialis* que compõem o Complexo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (CAB) (Wisplinghoff *et al.*, 2012). Tal complexo, consiste em seis espécies de bactérias fenotipicamente similares e genotipicamente próximas, sendo elas *A. baumannii*, *A. pittii* e *A. calcoaceticus*, *A. nosocomialis*, *A. seifertii* e *A. lactucae* (Villalón *et al.*, 2019; Almeida *et al.*, 2013; Snelling *et al.*, 1996).

Dentre as espécies que compreendem o CAB, *A. baumannii* é o patógeno causador de

infecções humanas mais comum em unidades de terapia intensiva (UTI) no mundo (Stanbro *et al.*, 2020). Seu impacto decorre principalmente dos mecanismos de resistência de bomba de efluxo, alteração do sítio alvo e alteração da permeabilidade da membrana atribuídos à espécie, concedendo-lhe resistência a várias classes de antimicrobianos (Verma *et al.*, 2021).

A. baumannii é caracterizado como um patógeno oportunista que está associado frequentemente a pacientes imunocomprometidos, principalmente aqueles com permanência prolongada (Howard *et al.*, 2012). Dentre as principais infecções, pode provocar pneumonia associada ao equipamento de ventilação, infecções no trato urinário e bacteremia (Antunes; Visca; Towner, 2014).

Além do *A. baumannii*, as demais espécies, *A. pittii*, *A. nosocomialis*, *A. seifertii* e *A. lactucae* se caracterizam como as mais preocupantes do CAB, tendo em vista a resistência aos antimicrobianos e a habilidade em permanecer em ambientes hospitalares (Wisplinghoff *et al.*, 2010; Villalón *et al.*, 2019). Concomitantemente, *A. calcoaceticus* consiste em uma espécie ambiental não relacionada a doenças clínicas (Howard *et al.*, 2012). Dessa forma, torna-se essencial para a realização de estudos epidemiológicos a distinção dos isolados, principalmente de *A. baumannii* (Snelling *et al.*, 1996).

Para além das espécies que compõem o CAB, outras espécies vêm tendo sua importância clínica reconhecida (Turton *et al.*, 2010). Sendo cada vez mais relatadas na literatura, principalmente associada a resistência aos antimicrobianos. *A. bereziniae*, *A. soli* e *A. junii* já foram descritas como agentes causadores de infecções, enfatizando a importância da distinção dos isolados (Baraka *et al.*, 2020).

2.3. Gênero *Pseudomonas* e *Pseudomonas aeruginosa*

O gênero *Pseudomonas* é caracterizado por ser um grande e complexo grupo de organismos pertencentes à família *Pseudomonadaceae*, compreendendo mais de 200 espécies descritas, sendo algumas delas de interesse clínico (Euzéby, 2009). Dentro do gênero, *P. aeruginosa* possui maior importância clínica, mais comumente relatada por estar associada a infecções humanas, em animais de sangue quente (mamíferos e aves) e devido a sua multirresistência aos antimicrobianos que dificultam sua erradicação, elevando os índices de morbidade e mortalidade (Neves *et al.*, 2011; Lorenzo, 2014).

P. aeruginosa compreende uma espécie bacteriana de interesse clínico e epidemiológico, pois consiste no principal microrganismo responsável por provocar IRAS dentre as bactérias não fermentadoras de glicose (Santos *et al.*, 2015). Ademais, é considerado um microrganismo Gram-negativo oportunista que pode ser contraído em hospital, afetando

principalmente indivíduos imunocomprometidos. Sendo capaz de causar infecções no trato urinário, em queimaduras, em procedimentos cirúrgicos, olhos e sangue (Mielko *et al.*, 2019).

Além de *P. aeruginosa*, outras espécies do gênero *Pseudomonas* como *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. monteilii*, *P. otitidis*, *P. mosseli*, *P. stutzeri*, entre outras, são também consideradas espécies de importância médica, porém infecções envolvendo essas espécies são mais incomuns (PHE, 2015). A exemplo, *P. fluorescens* vem sendo descrita como capaz de provocar infecção iatrogênica, de modo que sepse, choque séptico e formação de coágulo podem ocorrer devido a infecção. Já *P. stutzeri* é descrita como estando associada a endocardite (Hu *et al.*, 2022). Por outro lado, também é descrita como uma espécie encontrada em plantas, onde dificilmente é a causa de doenças humanas. Enquanto isso, *P. aeruginosa* consiste em uma espécie amplamente reconhecida por causar diversas enfermidades (Matar, 2018; Nikel; De Lorenzo, 2018).

Infecções causadas por isolados de *P. aeruginosa* se caracterizam como sendo de difícil tratamento devido a resistência intrínseca da espécie, de modo que infecções provenientes do ambiente de assistência à saúde provocam o aumento do tempo de internação, mortalidade e custo de tratamento. Todavia, a mortalidade pode ser minimizada a partir do tratamento precoce com administração do medicamento adequado (Çopur Çiçek, Ayşegül *et al.*, 2021). Dessa forma, torna-se essencial a identificação das espécies de *Pseudomonas* com o intuito de realizar a intervenção clínica mais adequada (Gomila *et al.*, 2017).

A identificação de *P. aeruginosa* apresenta desafios devido a sua diversa presença ambiental e proximidade fenotípica entre as espécies de *Pseudomonas*, dificultando a identificação precisa. A utilização de métodos baseados em cultura contribui para a identificação errônea das espécies pertencentes ao gênero, como foi observado por Taudien *et al.* (2023). Tal cenário torna-se mais alarmante no ambiente clínico, onde a classificação equivocada promove a atribuição inadequada do tratamento.

2.4 Métodos de Identificação Bacteriana

A identificação de amostras de origem clínica requer metodologias apropriadas a serem utilizadas pelos laboratórios. Os métodos clássicos como utilização de meios de cultura adequados, microscopia, ensaios antígeno-anticorpo e testes moleculares para detecção de ácidos nucleicos consistem nas principais abordagens utilizadas (Bursle; Robson, 2016).

A microscopia, o cultivo bacteriano e imunoensaios vem sendo utilizados como fontes de obtenção de dados em laboratório, para a realização de identificação e diagnósticos (Schmitz *et al.*, 2022). A utilização de métodos tradicionais, como o cultivo bacteriano e

testes bioquímicos, para identificação de bactérias patogênicas consistem em métodos fáceis, de baixo custo e padronizados. Todavia, não permitem a diferenciação entre o microrganismo alvo e não-alvo, são laboriosos, requerem muito tempo e não são recomendados para microrganismos de difícil cultivo ou não cultiváveis (Franco-Duarte *et al.*, 2019). Nesse sentido, bactérias patogênicas capazes de serem cultivadas em razoável intervalo de tempo podem ter seu cultivo *in vitro* considerado padrão-ouro. Uma vez que se obtém o patógeno isolado, este pode vir a ser submetido ao teste de susceptibilidade aos antimicrobianos, garantindo o uso do agente antimicrobiano mais adequado (Bursle; Robson, 2016).

Métodos baseados na utilização de meios de cultura consistem predominantemente na identificação preliminar da bactéria isolada através da observação das características da colônia formada. Tais características auxiliam na seleção de meios de culturas diferenciais e testes com o intuito de identificar cepas isoladas (Koneman *et al.*, 2017). Os testes bioquímicos são utilizados para identificação de bactérias a partir da produção de enzimas que participam dos processos de descarboxilação e desidrogenação, além da capacidade de fermentação (Tortora; Case; Funke, 2016).

As contribuições dadas por Fanny Hesse (1881) e Richard Petri (1887) marcaram o início do avanço da identificação microbiana (Hesse; Gröschel, 1992; Petri, 1887). A utilização de ágar em meios de cultura e o desenvolvimento da placa de Petri, respectivamente, proporcionaram a realização do isolamento e a propagação de culturas bacterianas puras, aspecto essencial para a identificação por permitir a caracterização inicial por padrões morfológicos e bioquímicos (Bonnet *et al.*, 2020).

Posteriormente, até o final da década de 1960, as reações bioquímicas eram realizadas de forma manual em tubos de ensaio. Porém, tal cenário é alterado com a inserção de sistemas miniaturizados manuais para a realização de uma identificação mais rápida. Uma vez que estes consistem em kits que pré-selecionam testes bioquímicos para os diferentes grupos de microrganismos (Janda; Abbott, 2002). No decurso, a necessidade de tempo de resposta menor, maior eficiência e a maior capacidade de realização de testes bioquímicos, compreenderam os fatores que impulsionam a introdução da automação da identificação bioquímica na rotina laboratorial.

Desenvolvido na década de 1970, o sistema automatizado Vitek® (bioMérieux) é um dos exemplos atuais disponíveis comercialmente que possuem um sistema automatizado de microdiluição em caldo que determina o crescimento microbiano a partir da emissão e detecção de luz por *scanner* óptico (Arbefeville; Timbrook; Garner, 2024). Um dos mais comumente utilizados pois permite tanto a identificação quanto a determinação da

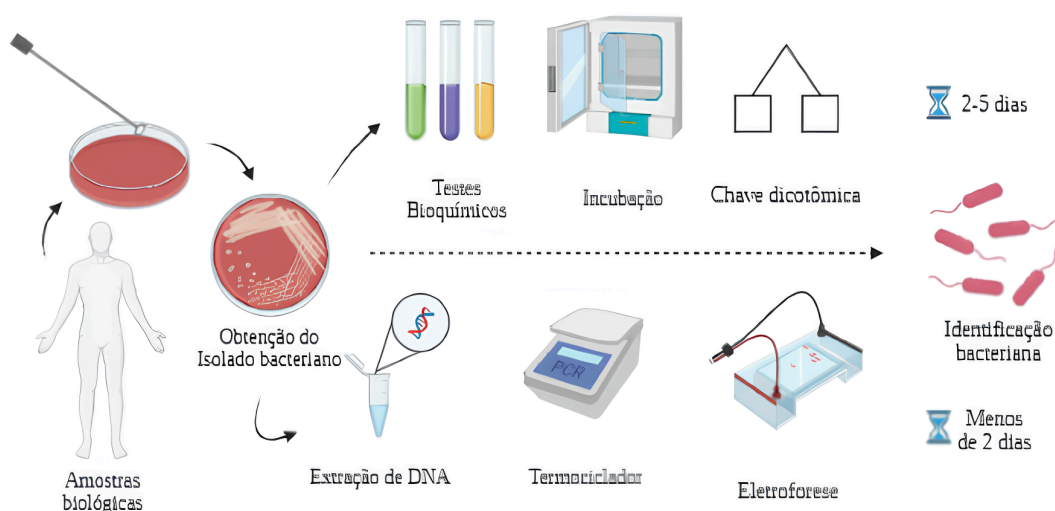
suscetibilidade do microrganismo aos antimicrobianos (Buszewski *et al.*, 2017).

Esses sistemas automatizados disponíveis comercialmente utilizam de vários testes bioquímicos com o intuito de aumentar a exatidão da identificação e realizam a incubação, análise e interpretação dos resultados que são comparados com o banco de dados (Klingler *et al.*, 1992). Apesar de ser um sistema robusto e versátil para identificação microbiana, há a possibilidade de geração de resultados com baixa confiabilidade para algumas espécies bacterianas, a exemplo das *Pseudomonas* sp. e *Acinetobacter* sp. (Franco-Duarte *et al.*, 2019; Klingler *et al.*, 1992).

De modo geral, a identificação bioquímica compreende métodos que são extensivamente empregados e utilizados principalmente em rotinas laboratoriais onde é necessário identificar um microrganismo de forma rápida (diagnóstico médico). Contudo, os resultados são observados após dias, tendo a possibilidade de falsos-positivos quando há espécies bacterianas semelhantes (Franco-Duarte *et al.*, 2019).

Os métodos baseados em meios de cultura limitam-se seu uso aos microrganismos cultiváveis. Tais métodos vêm sendo substituídos ou utilizados em conjunto com os métodos que não se baseiam em cultura, como a amplificação de ácidos nucleicos (Al-Nakkas; Mustafa; Wright, 2005). Essas novas tecnologias vêm permitindo a rápida e precisa identificação de espécies através do desenvolvimento de testes moleculares baseados na amplificação do DNA e/ou RNA, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (Abdel Aziz *et al.*, 2006).

Figura 1. Comparação entre o método bioquímico e o baseado em amplificação de ácidos nucleicos por PCR.



Fonte: Autor (2024).

O aumento do uso de metodologias baseadas em biologia molecular vem melhorando o entendimento epidemiológico de microrganismos, onde os métodos genotípicos vem auxiliando na compreensão da transmissão de patógenos entre indivíduos (Das Neves *et al.*, 2023). Isso se deve ao fato dos métodos moleculares apresentarem maior sensibilidade e menor tempo de resposta quando comparados aos métodos baseados em cultura, podendo ser utilizados com microrganismos cultiváveis ou não *in vitro* (Mustafa, 2024).

Como consequência, métodos como Espectrometria de Massas por Dessorção/Ionização a Laser por Tempo de Vôo (MALDI-TOF), PCR, Sequenciamento do Genoma Completo (WGS) e dos genes 16S rRNA, *gyrB*, *recA* e região ITS vem sendo descritas como métodos para identificação de patógenos de interesse clínico como mostrado na Tabela 1 (Public Health England, 2015).

Tabela 1. Alguns métodos de identificação bacteriana utilizados e suas principais características.

Método de Identificação	Características	Referência (s)
Microscopia	Relativamente barato, resultados em minutos, altamente específico para algumas infecções, padrão-ouro para a identificação parasitária, baixa sensibilidade, requer alta habilidade do operador para o diagnóstico, apresenta melhor eficiência quando combinado com métodos.	Bursle; Robson, 2016.
Cultura bacteriana	Métodos fáceis, de baixo custo, padronizados, não permitem a diferenciação entre o organismo alvo e não-alvo, laboriosos, requerem muito tempo e não são utilizáveis em microrganismos de difícil cultivo ou não cultiváveis	Franco-Duarte <i>et al.</i> , 2019
Testes Bioquímicos	Amplamente utilizados para diferenciação bacteriana, desenvolvidos para diferenciação rápida em hospitais, requer grande número de testes para identificação correta, mutações e plasmídeos podem resultar em linhagens com características bioquímicas diferentes.	Tortora; Case; Funke, 2016.
Sorologia	Baseada na variação de antígenos bacterianos entre espécies, utilizada para identificação e vigilância epidemiológica envolvendo a utilização de anticorpos específicos.	Henriksen, 1997.
Southern Blotting	Altamente sensível e específico para detecção de sequências específicas de DNA, requer muito tempo para sua execução, necessita de DNA genômico de alta qualidade, utiliza sondas para hibridização e membrana de nitrocelulose e apresenta desafios quanto a precisão e eficiência quando comparado a metodologias mais modernas.	Chang, 2020; Voet, Voet
MALDI-TOF	Identificação precisa, necessita de atualização frequente da base de dados, não identifica microrganismo sem seu espectro de referência.	PHE, 2015; Koneman <i>et al.</i> , 2017

PCR	Menor tempo de resposta, alta sensibilidade, altamente adaptável, permite identificação múltipla de patógenos, mutações na sequência pode levar a falsos-negativos, contaminações podem gerar falsos-positivos, utiliza ácidos nucleicos sem a necessidade de organismos viáveis.	Bursle; Robson, 2016.
Gene 16S rRNA	Método de identificação genotípico, altamente utilizado para classificação bacteriana a nível de gênero e espécie.	
Gene <i>gyrB</i>	Marcador molecular utilizado em estudo filogenético, utilizado para a identificação de espécies bacterianas a nível de gênero.	PHE, 2015.
Gene <i>recA</i>	Apresenta alto poder discriminatório, limitado para estudos taxonômicos, utilizado para identificação de espécies bacterianas.	
Região ITS	Sequência não codificadora, utilizado para análise filogenética bacteriana e identificação, geralmente associada a NGS.	Hu <i>et al.</i> , 2022
WGS	Pode detectar muitos patógenos simultaneamente, utiliza todo material genômico do organismo, pode utilizar tecnologia Next-generation sequencing (NGS), permite o sequenciamento de muitos genes em uma única vez, requer uso de ferramentas de bioinformática.	Mustafa, 2024; Van El <i>et al.</i> , 2013; PHE, 2015.

Fonte: Autor (2024).

Dentre os métodos utilizados, as PCRs vêm sendo desenvolvidas, pois caracterizam-se como um método simples, rápido, sensível e específico (Chang *et al.*, 2021; Phe, 2015). A PCR é uma técnica promissora e vem sendo utilizada para a identificação de microrganismos a partir da amplificação de genes específicos. Tradicionalmente, a PCR envolve apenas um gene-alvo e seus oligonucleotídeos iniciadores específicos, caracterizando uma PCR uniplex (Chang *et al.*, 2021; Mustafa *et al.*, 1995). Diante desse cenário, variações foram desenvolvidas, incluindo a PCR Multiplex. Esta consiste na amplificação de dois ou mais genes-alvo em uma mesma reação, permitindo a identificação de diversos patógenos (Chang *et al.*, 2021) e resultando na diminuição do tempo e esforço necessário em laboratório (Markoulatos *et al.*, 2002).

Todavia, a PCR Multiplex apresenta seus desafios, sendo estes relacionados principalmente com a formação de dímeros de oligonucleotídeos, podendo ser contornados, resultando em ensaios específicos. Ademais, os requerimentos básicos incluem a amplificação dos genes-alvos sob as mesmas condições de reação, onde os produtos gerados necessitam serem de tamanhos diferentes, tornando o processo de otimização da metodologia essencial a fim de evitar baixa sensibilidade e especificidade (Guerra *et al.*, 2022; Markoulatos *et al.*, 2002; Mustafa *et al.*, 1995).

2.4.1. Reação em Cadeia da Polimerase - PCR

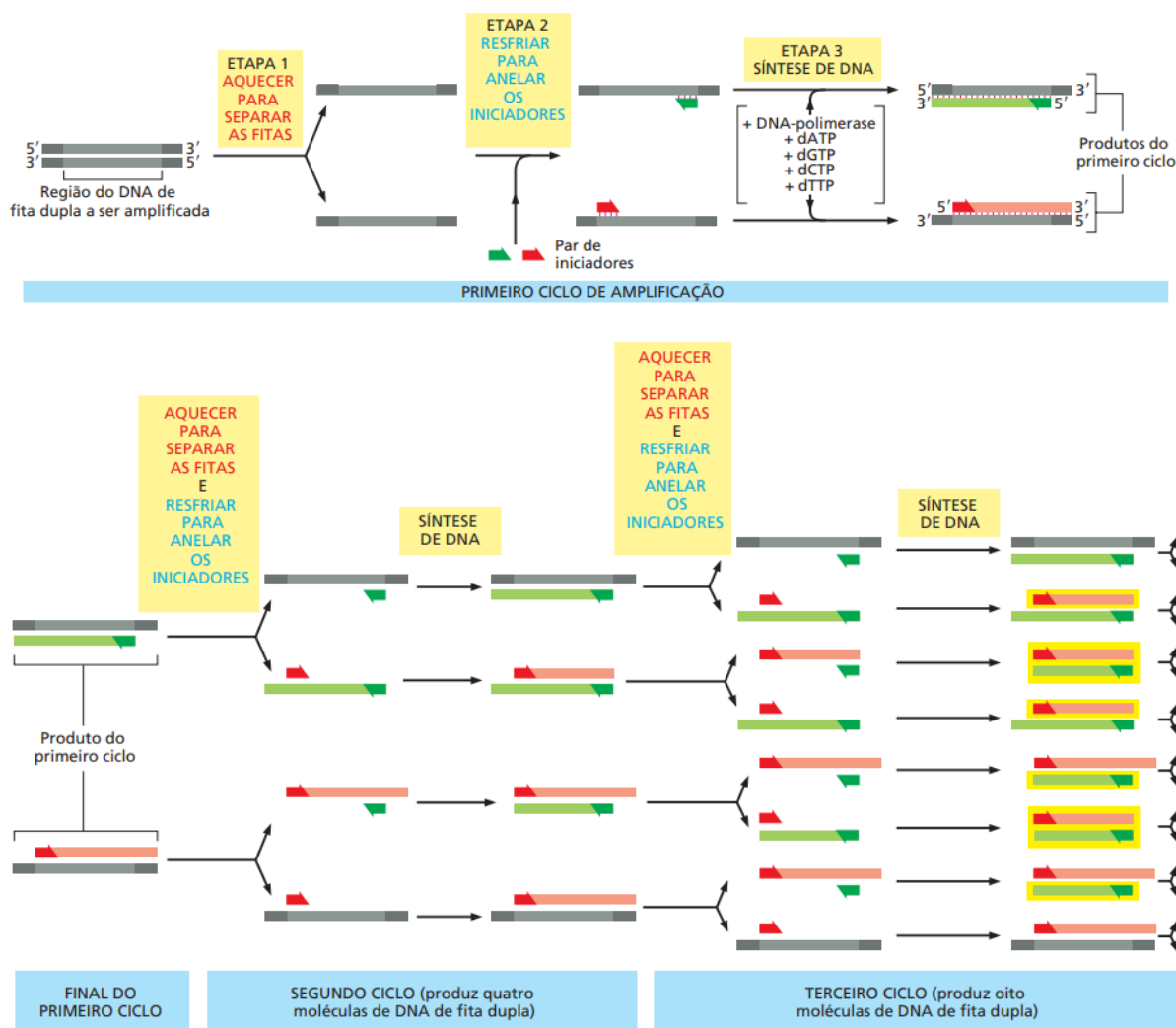
Historicamente, a PCR consiste em uma técnica molecular desenvolvida por Mullis e Faloona na década de 1980 (Mullis; Faloona, 1987) a partir da observação da técnica de sequenciamento de Sanger (Zhu *et al.*, 2020). Todavia, o desenvolvimento da PCR apenas se tornou possível graças às descobertas essenciais da estrutura do DNA por Watson e Crick (1953) e da DNA polimerase por Kornberg (1955) (Lehman, 2003; Watson; Crick, 1953). Ao decorrer do tempo, os procedimentos baseados em DNA se tornaram cada vez mais frequentes em laboratórios, onde a PCR vem se tornando uma técnica indispensável (Analytical Methods Committee, 2024).

Tecnicamente, a PCR consiste em ciclos de desnaturação, anelamento e extensão do fragmento de DNA específico pré-selecionado pelos oligonucleotídeos. Envolvendo uma reação com componentes básicos que inclui o DNA molde, oligonucleotídeos, tampão da reação, nucleotídeos (dNTPS), enzima polimerase, sal e água (Voet; Voet; Pratt, 2014; Analytical Methods Committee, 2024).

A desnaturação consiste no aquecimento (90-94°C) para promover a separação da dupla fita de DNA, permitindo que os oligonucleotídeos se liguem posteriormente a sequência-alvo em temperatura mais baixa (55-70°C) para que seja promovido o seu anelamento. Uma vez anelado, os oligonucleotídeos atuam como ponto de referência, iniciadores, para a ação da enzima DNA polimerase que realiza a extensão da sequência-alvo por complementaridade a 72°C (Voet; Voet; Pratt, 2014).

Inicialmente, a cada ciclo deve-se adicionar mais enzima para promover a etapa de extensão, pois esta perde sua atividade devido a alta temperatura na etapa de desnaturação. Contudo, com a descoberta e utilização da DNA polimerase proveniente da bactéria *Thermus aquaticus* (Taq polimerase), se eliminou a necessidade de adição da enzima a cada ciclo (Zhu *et al.*, 2020). Sem a necessidade de adição, a PCR passou a compreender em ciclos de ajuste de temperatura para promover a síntese exponencial de uma região do DNA delimitada pelos oligonucleotídeos. A representação das etapas e ciclos podem ser observados na figura abaixo.

Figura 2. Representação dos ciclos da PCR e amplificação exponencial da sequência-alvo.



Fonte: Alberts *et al.* (2017).

Dentre os genes utilizados para identificação de espécies bacterianas e amplificados por PCR, 16S rRNA, *recA*, Região ITS são descritos como utilizados para a realização de estudos filogenéticos, taxonômicos e para identificação microbiana. De modo que o gene 16S rRNA é utilizado como método de identificação genotípica pois é altamente específico para cada espécie, tornando-o um alvo ideal (Franco-Duarte *et al.*, 2019). Em contrapartida, em casos onde o gene 16S rRNA é similar entre duas espécies relacionadas, outros genes conservados são utilizados como alvo para identificação (Reller *et al.*, 2007).

Enquanto isso, o gene *recA* (codifica a enzima recombinase A), apresenta baixa resolução taxonômica, porém é bastante utilizado para diferenciação e identificação de algumas espécies bacterianas (PHE, 2015). Já a região ITS consiste em uma região não codificadora, também denominada de gene 16S-23S rRNA espaçador transcrito internamente (*gene internal transcribed spacer*), que é utilizado em estudos filogenéticos e de identificação

de microrganismos, sendo mais específico quando comparado ao gene 16S rRNA (Gurtler, et. al, 2016).

Dessa forma, a rápida detecção de microrganismos consiste em um desafio para manutenção da saúde pública, onde os laboratórios de microbiologia atuam com um papel vital para a realização da identificação microbiana de forma precisa. De modo que métodos padronizados são essenciais para a coleta de dados e monitoramento de agentes patogênicos (Pruden *et al.*, 2021; Franco-Duarte *et al.*, 2019).

2.4.2. Identificação de *Acinetobacter*

As espécies de *Acinetobacter* se caracterizam por serem cocobacilos Gram-negativos que podem apresentar-se como diplococos. Suas colônias bacterianas são consideradas lisas ou mucóides com coloração que varia entre amarelo pálido a esbranquiçada, podendo ou não apresentar a produção de pigmento. Tais características não garantem uma identificação precisa, tornando os métodos moleculares necessários para esse fim (PHE, 2015).

Os métodos de identificação de espécies de *Acinetobacter* não são padronizados. As cepas pertencentes ao gênero apresentam similaridade fenotípica e são geneticamente próximas, agrupando algumas espécies em um complexo, o CAB (Almeida; Araújo, 2013; Marchaim *et al.*, 2007). Tal similaridade faz com que os métodos baseados em cultura, considerados simples e dispendiosos, sejam viáveis para utilização apenas com o intuito de triagem (Lellouche *et al.*, 2024).

Nesse sentido, a identificação por métodos moleculares tornam-se indispensáveis. Assim, métodos baseados em PCR vem sendo utilizado para a amplificação de genes, como *bla*_{OXA-51-like} intrínseco a *A. baumannii*, para fins de identificação. Além disso, o MALDI-TOF também vem sendo utilizado para a identificação de espécies de *Acinetobacter* (PHE, 2015).

Como a identificação fenotípica é considerada inadequada, a identificação de espécies de *Acinetobacter* pode ser realizada a partir dos genes 16S rRNA, região ITS, gene *recA*, ou combinações destes (Chen *et al.*, 2007). Outros métodos vêm sendo utilizados, porém consistem em métodos caracterizados por requerem tempo significativo e de difícil interpretação dos dados obtidos (Van Dessel *et al.*, 2004). Dessa forma, a identificação e diferenciação de espécies de *Acinetobacter* desenvolve um papel fundamental, uma vez que realizada de forma incorreta, pode acarretar em falhas no processo de vigilância epidemiológica das espécies (Freitas; Camargo, 2021).

2.4.3. Identificação de *Pseudomonas*

O gênero *Pseudomonas* é considerado um grupo metabolicamente diverso, sendo o isolamento de colônias bacterianas das espécies realizado a partir do uso de meio de cultura seletivo para *Pseudomonas* contendo Cetrimida. Onde as colônias formadas se caracterizam pela diversidade morfológica das espécies. Colônias de *P. aeruginosa*, por exemplo, são achatadas, espalhadas, podendo ser também lisas, mucóides e podem ou não apresentar a produção de pigmentos que na presença de luz UV emitem fluorescência. Ademais, possuem odor que remete a uvas (Hu *et al.*, 2022; PHE, 2015).

Todavia, métodos baseados no fenótipo podem resultar na identificação errônea das espécies de *Pseudomonas*. Assim, os métodos baseados no genótipo são frequentemente utilizados, pois contornam a variação fenotípica das espécies e garantem uma identificação mais precisa (Spilker *et al.*, 2004). Tradicionalmente, a identificação molecular de *Pseudomonas* possui como foco sequências específicas do DNA genômico, onde métodos que utilizam o gene 16S rRNA vêm sendo utilizados (Slatko *et al.*, 2018).

Ademais, outras metodologias como MALDI-TOF, PCR, utilizando o gene *gyrB*, e Whole Genome Sequencing (WGS - sequenciamento de genoma completo) vem sendo utilizadas como intuito de identificação, realização de estudos taxonômicos e filogenéticos de modo que se diferenciam com base no poder de discriminação e volume de dados obtidos. Sendo a PCR considerada e utilizada para identificação rápida de *P. aeruginosa* e diferenciação de espécies filogeneticamente próximas (Spilker *et al.*, 2004; PHE, 2015).

3. JUSTIFICATIVA

A identificação fenotípica isolada de *Acinetobacter* sp. e *Pseudomonas* sp. é muitas vezes inadequada. Métodos baseados em identificação molecular se mostram eficazes para a diferenciação de espécies bacterianas. Sendo os métodos baseados em PCR que utilizam de genes específicos e, conseqüentemente, oligonucleotídeos específicos, determinantes para realizar uma identificação bem-sucedida (Chen *et al.*, 2007).

Um dos métodos baseados em PCR consiste na técnica da reação em cadeia da polimerase Multiplex. Uma variação do PCR convencional que permite a amplificação de sequências alvo com a utilização de oligonucleotídeos específicos que é utilizada devido a sua rapidez, baixa complexidade e baixo custo (Guerra *et al.*, 2022; Markoulatos *et al.*, 2002). Além disso, trata-se de um método eficaz para o diagnóstico de agentes etiológicos bacterianos, fúngicos, virais e parasitários (Elnifro *et al.*, 2000).

Os métodos convencionais de diagnósticos, como o ensaios imunológicos requerem tempo, qualificação e conhecimento técnico específico para cada técnica. Em decorrência, ensaios de PCR Multiplex vêm sendo desenvolvidos, permitindo a identificação de uma variedade de agentes etiológicos com menor custo e mais eficiência (Chang *et al.*, 2021).

4. OBJETIVOS DA PESQUISA

4.1 Objetivo Geral

Diferenciar as espécies *A. baumannii* e *P. aeruginosa* dentre outros isolados de origem hospitalar identificados como pertencentes aos gêneros *Acinetobacter* e *Pseudomonas*, respectivamente.

4.2 Objetivos Específicos

- Realizar a seleção dos isolados bacterianos;
- Realizar a PCR de identificação das espécies;
- Determinar a frequência de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* dentre os isolados hospitalares.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Caracterização dos isolados bacterianos

Os isolados bacterianos são provenientes de amostras clínicas de um hospital regional localizado em Mossoró - RN. Recuperados do estoque do LABMIC - UFERSA consistindo em 40 isolados de *Acinetobacter* sp. e 40 isolados de *Pseudomonas* sp., totalizando 80 isolados. Identificados por testes bioquímicos realizados de forma manual ou automatizada (Sistema Vitek®) no hospital de origem dos isolados bacterianos, apresentando perfil de multirresistência. Todos os isolados utilizados já se encontravam armazenados no Laboratório de Microbiologia Clínica (LABMIC) da UFERSA conservados em meio BHI com glicerol (20%) em Ultrafreezer a -80°C. Este estudo está incluído dentro de um projeto que foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, sob o parecer de número 4.708.190.

5.2. Extração de DNA e detecção das espécies bacterianas

A extração do DNA bacteriano foi realizada por lise mecânica, conforme descrito anteriormente por Ribeiro (2016). Brevemente, suspensões das colônias bacterianas em água ultrapura (livre de DNA e RNA) foram submetidas a três ciclos de 30 segundos em banho ultra-sônico, seguido de centrifugação por três minutos a 13000 rpm. A detecção das espécies bacterianas de *Acinetobacter* sp. e *Pseudomonas* sp. foi realizada pela técnica de reação em cadeia da polimerase - PCR. Para a reação foram utilizados os oligonucleotídeos descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados para a identificação de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* por PCR.

Alvo	Oligonucleotídeos	Gene	Sequência	Tam.	Temp. de Anelamento	Ref.
<i>A. baumannii</i>	P-Ab-ITS	ITS region	F: 5' – CATTATCACGGTAATTAGTG – 3' R: 5' – AGAGCACTGTGCACTTAAG – 3'	208-pb	55°C	CHEN et. al, 2007.
	P-rA1 recA	<i>recA</i>	F: 5' – CCTGAATCTTCTGGTAAAAC – 3' R: 5' – GTTCTGCTGGGCTGCCAAACATTAC – 3'	425-pb		
	OXA-51	<i>bla_{OXA}</i> -51-like	F: 5' – TAATGCTTTGATCGGCCTTG – 3' R: 5' – TGGATTGCACTTCATCTTGG – 3'	353-pb	52°C	HIGGIN S et. al, 2010.
<i>P. aeruginosa</i>	PA-GS	16S rDNA	F: 5' – GACGGGTGAGTAATGCCTA – 3' R: 5' – CACTGGTGTTCCTTCCTATA – 3'	618-pb	54°C	SPILKE R et. al, 2004.
	PA-SS	16S rDNA	F: 5' – GGGGGATCTTCGGACCTCA – 3' R: 5' – TCCTTAGAGTGCCACCCG – 3'	956-pb	58°C	

Fonte: Autor (2024).

As reações em cadeia da polimerase para os isolados de *Acinetobacter* sp. consistiram na utilização de 12,5 µL de Master mix (Promega®), 2 µL de DNA, 6,5 µL de água pura, 1 µL de oligonucleotídeo forward P-Ab-ITS, 1 µL de oligonucleotídeo reverse P-Ab-ITS, 1 µL de oligonucleotídeo forward P-rA1 *recA* e 1 µL de oligonucleotídeo reverse P-rA1 *recA*, totalizando 25 µL de solução. As condições de amplificação no termociclador consistiram na desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos e extensão final a 72°C por 7 minutos.

As reações para amplificação do gene-alvo *bla*_{OXA-51-like}, intrinsecamente associado a *A. baumannii*, foram realizadas com a utilização de 12,5 µL de Master mix (Promega®), 2 µL de DNA, 8,5 µL de água pura, 1 µL de oligonucleotídeo forward OXA-51-F e 1 µL de oligonucleotídeo reverse OXA-51-R. As condições utilizadas no termociclador consistiram na desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguidos de 29 ciclos de desnaturação a 94°C por 25 segundos, anelamento a 52°C por 40 segundos, extensão a 72°C por 50 segundos, finalizando com extensão final a 72°C por 6 minutos.

A amplificação dos genes-alvo para a identificação dos isolados *Pseudomonas* sp. foi realizada por meio da utilização de 12,5 µL de Master mix (Promega®), 2 µL de DNA, 8,5 µL de água pura, 1 µL de oligonucleotídeo forward PA-GS-F e 1 µL de oligonucleotídeo reverse PA-GS-R, para identificação a nível de gênero. Para identificação a nível de espécie, *P. aeruginosa*, foram mantidas as quantidades dos reagentes, porém com a substituição do oligonucleotídeo utilizado, PA-GS, por PA-SS.

As condições de amplificação em termociclador se inicia com a desnaturação a 95°C por 3 minutos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 58°C para o oligonucleotídeo PA-SS e 54°C para o oligonucleotídeo PA-GS, extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 3 minutos.

Os amplicons foram visualizados em gel de agarose a 1,5% corado com GelRed (Invitrogen®) (10 µL) e a corrida de eletroforese realizada a 100 volts, 200 mA por 50 minutos. Posteriormente, o gel pós-corrida foi exposto à luz UV, com auxílio de um transiluminador, para a visualização, registro fotográfico e interpretação das bandas formadas de acordo com a tabela 3.

Tabela 3. Interpretação dos resultados da PCR para identificação de *Acinetobacter* sp. e *Pseudomonas* sp.

Oligonucleotídeos	Gene	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>A. baumannii</i>	<i>P. aeruginosa</i>
P-Ab-ITS	ITS region	-	-	+	-
P-rA1 recA	<i>recA</i>	+	-	+	-
OXA-51	<i>bla</i> _{OXA-51-like}	+ / -	-	+	-
PA-GS	16S rDNA	-	+	-	+
PA-SS	16S rDNA	-	-	-	+

Fonte: Autor (2024).

Os genes a serem detectados e os oligonucleotídeos utilizados para a identificação foram descritos anteriormente por Chen *et al.* (2007), para a identificação de *Acinetobacter* sp. pelos genes ITS region e *recA*, e por Spilker *et al.* (2004), para identificação de *Pseudomonas* sp. por 16S rDNA. Já o gene *bla*_{OXA-51-like} foi utilizado por Higgins *et al.* (2010) para a identificação de *A. baumannii*, pois se caracteriza como um gene intrínseco à espécie. Sendo a interpretação dos resultados das PCRs para detecção dos genes descritos, e consequentemente, a identificação da espécie bacteriana realizada de acordo com a tabela acima. Os resultados obtidos foram registrados em formulário próprio.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os isolados foram coletados entre os anos de 2019 e 2024, sendo a maioria de 2023. Com relação à ala hospitalar, os isolados foram recuperados prioritariamente de amostras de pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI), seguido de Unidade de Paciente Infectado (UPI) e Clínica Médica (CM). Os tipos de amostra clínica mais prevalentes foram secreção traqueal, seguida de urina e sangue. O resumo da caracterização das amostras está exposto na Tabela 4.

Tabela 4. Caracterização dos isolados bacterianos de origem hospitalar utilizados para identificação baseada em PCR.

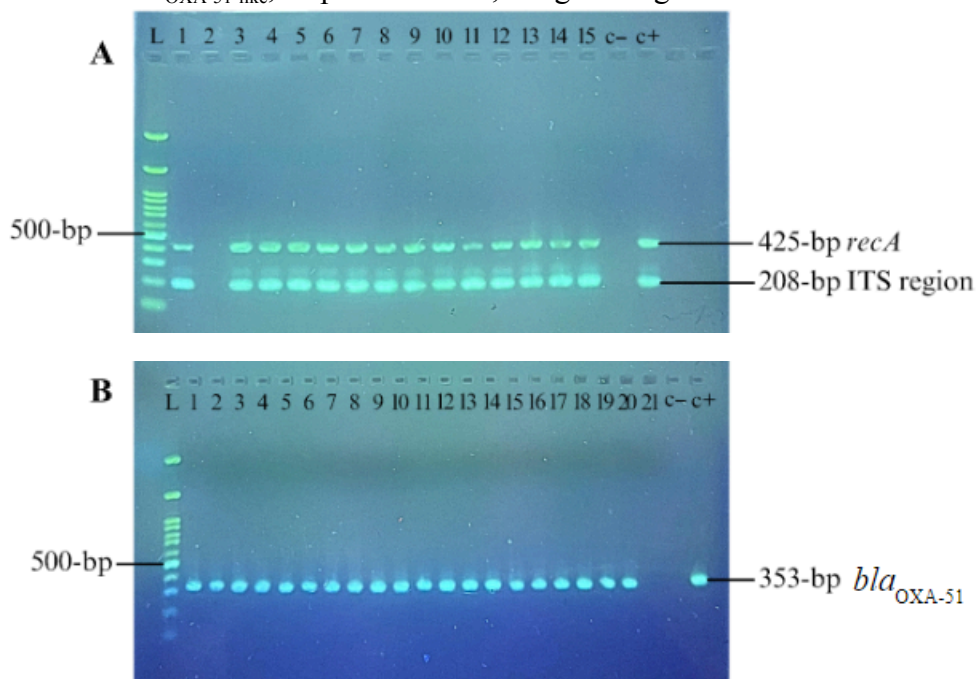
Ano de coleta	Gênero/Espécie Nº (%)	
	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>P. aeruginosa</i>
2019	2 (5%)	2 (5%)
2020	4 (10%)	4 (10%)
2021	3 (7,5%)	2 (5%)
2022	6 (15%)	4 (10%)
2023	18 (45%)	21 (52,5%)
2024	7 (17,5%)	7 (17,5%)
Tipo de Amostra Clínica		
Ponta de catéter	3 (7,5%)	2 (5%)
Sangue	8 (20%)	1 (2,5%)
Urina	2 (5%)	9 (22,5%)
Secreção traqueal	21 (52,5%)	19 (47,5%)
Outros	5 (12,5%)	6 (15%)
ND	1 (2,5%)	3 (7,5%)
Local de Internação		
UTI	31 (77,5%)	27 (67,5%)
UPI	3 (7,5%)	6 (15%)
CM	4 (10%)	4 (10%)
PSM	0	1 (2,5%)
ND	2 (5%)	2 (5%)

Fonte: Autor (2024). ND: Não Determinado; UTI: Unidade de Terapia Intensiva; UPI: Unidade de Paciente Infectado; CM: Clínica Médica; PSM: Pronto Socorro Masculino.

O processo de identificação se iniciou com a extração do DNA dos isolados bacterianos. Para os isolados de *Acinetobacter* sp., a PCR de identificação consiste em uma PCR Multiplex, com a amplificação de dois genes-alvos, região ITS e *recA*, em uma única

reação. O gene *bla*_{OXA-51-like} é utilizado como uma evidência adicional confirmativa da identificação para *A. baumannii*. Como pode ser evidenciado na Figura 3.

Figura 3. Gel de agarose 1,5% com os amplicons de PCR Multiplex e uniplex dos genes *recA*, região ITS e *bla*_{OXA-51-like}, respectivamente, em gel de agarose.

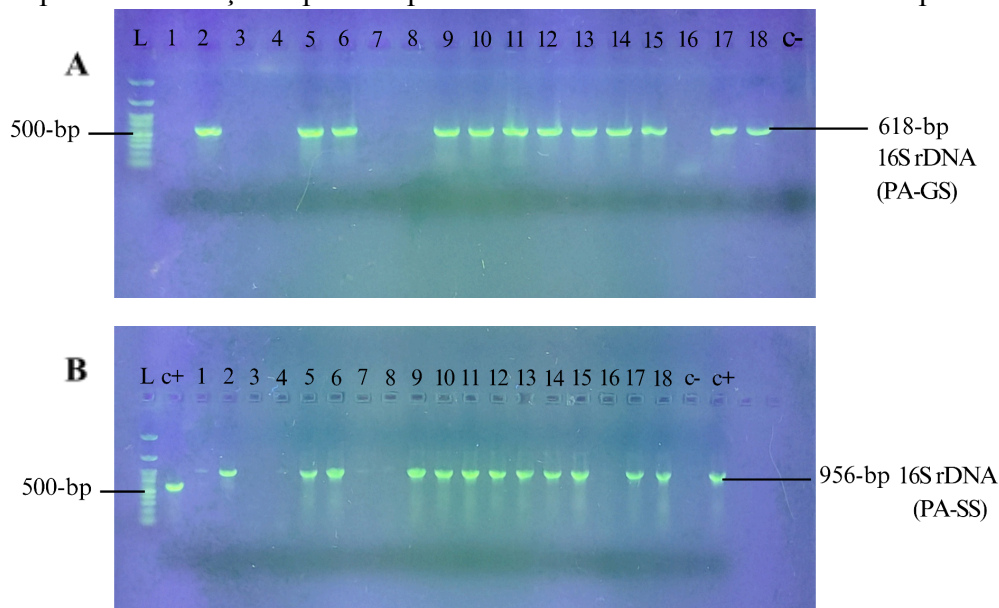


Fonte: Autor (2024). **(A)** Gel de agarose com amplicons dos genes *recA* e região ITS, sendo L: marcador de peso molecular; poços de 1 a 15: amplicons dos isolados de *Acinetobacter* sp. evidenciando a presença dos genes; c- : controle negativo; c+ : controle positivo, isolado clínico previamente identificada como *A. baumannii*. **(B)** Gel de agarose com amplicons do gene *bla*_{OXA-51-like}, sendo L: marcador de peso molecular; poços de 1 a 21: amplicons dos isolados de *Acinetobacter* sp. evidenciando a presença dos genes; c- : controle negativo; c+ : controle positivo, isolado clínico previamente identificada como *bla*_{OXA-51-like} positivo.

A identificação dos isolados de *Pseudomonas* sp.. pode ser observado na figura 4 e consiste em duas PCRs convencionais, uniplex, com amplificação de apenas um gene-alvo, 16S rDNA. A primeira voltada para a identificação a nível taxonômico de gênero (PA-GS) e a segunda correspondente em uma identificação espécie-específica (PA-SS), *P. aeruginosa*.

A identificação bioquímica realizada previamente demonstrou que todos os isolados foram identificados como *P. aeruginosa*. Em contrapartida, a identificação molecular por PCR foi de encontro às identificações bioquímicas, demonstrando a presença de outras espécies de *Pseudomonas* sp. Em adição, parte dos isolados bacterianos de *Pseudomonas* sp. não corresponderam às espécies pertencentes ao gênero.

Figura 4. Gel de agarose 1,5% com os amplicons de PCR uniplex do gene 16S rDNA em gel de agarose para identificação espécie-específica dos isolados de *Pseudomonas* sp..



Fonte: Autor (2024). (A) Gel de agarose com amplicons do gene 16S rDNA gênero-específico, sendo L: marcador de peso molecular; poços de 1 a 18: amplicons dos isolados de *Pseudomonas* sp. evidenciando a presença do gene; c- : controle negativo; c+ : controle positivo (ao lado do marcador molecular na imagem B), isolado clínico previamente identificada como *P. aeruginosa*. (B) Gel de agarose com amplicons do gene 16S rDNA espécie-específico, sendo L: marcador de peso molecular; poços de 1 a 18: amplicons dos isolados de *Pseudomonas* sp. evidenciando a presença do gene; c- : controle negativo; c+ : controle positivo, isolado clínico previamente identificada como *P. aeruginosa*.

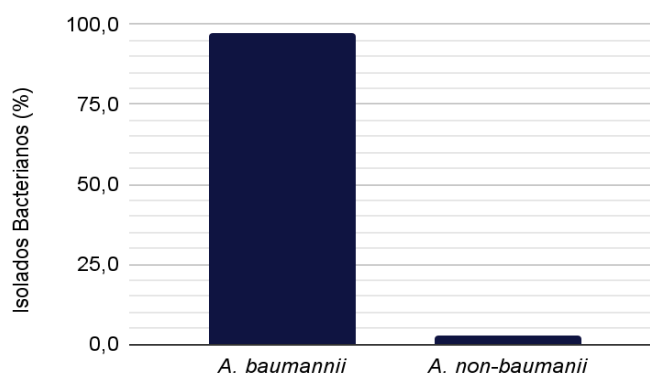
Os isolados bacterianos de *Acinetobacter* sp., compreenderam em maior prevalência em *A. baumannii*. Contudo, foi observado que a identificação por PCR evidenciou a presença de outras espécies de *Acinetobacter* sp.. Evidenciado no Gráfico 1. Dentre os isolados, 100% apresentaram o gene *recA*, pertencendo ao gênero *Acinetobacter* sp., seguido de 97,5% que apresentaram o gene da região ITS, identificados como *A. baumannii*. Apenas um isolado foi identificado como pertencente ao gênero *Acinetobacter* sp., correspondendo às espécies consideradas *A. non-baumannii*. Todos os isolados analisados apresentaram o gene *bla*_{OXA-51-like}.

A alta frequência de *A. baumannii* no ambiente hospitalar relatado neste estudo, corrobora com pesquisas anteriores. Jeong e colaboradores (2016), relataram uma alta frequência de *A. baumannii* em isolados clínicos, após parte dos isolados de *Acinetobacter* serem identificados erroneamente. Por outro lado, uma distribuição mais homogênea entre as espécies de *Acinetobacter* em isolados clínicos na Noruega foi descrita por Karah *et al.*

(2011), demonstrando uma maior frequência de *A. non-baumannii* entre os isolados, como *A. lwoffii*, *A. ursingi* e *A. radioresistens*.

A frequente associação de *A. baumannii* à ambientes hospitalares vem sendo atribuída a sua alta plasticidade genômica e capacidade de suportar o estresse hospitalar devido a aquisição de resistência aos antimicrobianos, contribuindo para sua maior frequência (Lucidi *et al.*, 2024). Em consonância, Atrouni *et al.* (2016) investigou possíveis reservatórios de *Acinetobacter* sp. fora do ambiente hospitalar, demonstrando que as espécies *A. non-baumannii* foram as mais frequentes. Fortalecendo a associação da *A. baumannii* aos ambientes de assistência à saúde. Nesse contexto, a alta frequência de *A. baumannii* em UTIs foi descrita por Golli *et al.* (2022) como sendo 97,77% (percentual equivalente ao relatado neste estudo, 97,5%), enfatizando a necessidade de medidas urgentes de controle.

Gráfico 1. Frequência de *A. baumannii* nos isolados bacterianos de origem hospitalar identificados pela técnica de PCR Multiplex.



Fonte: Autor (2024).

Quanto aos isolados de *Pseudomonas* sp., a identificação baseada em PCR uniplex apresentada constatou uma maior frequência de *P. aeruginosa* dentre os isolados, observado no Gráfico 2. Em seguida, foi possível perceber que 90% dos isolados apresentaram o gene 16S rDNA gênero-específico (PA-GS), sendo identificados como pertencentes ao gênero *Pseudomonas* sp.. Em adição, 85% dos isolados tiveram a detecção do gene 16S rDNA espécie-específico (PA-SS), identificados então como *P. aeruginosa*. Espécies não pertencentes ao gênero foram aqueles onde não houve detecção dos genes utilizados para identificação, categorizados então como outras espécies.

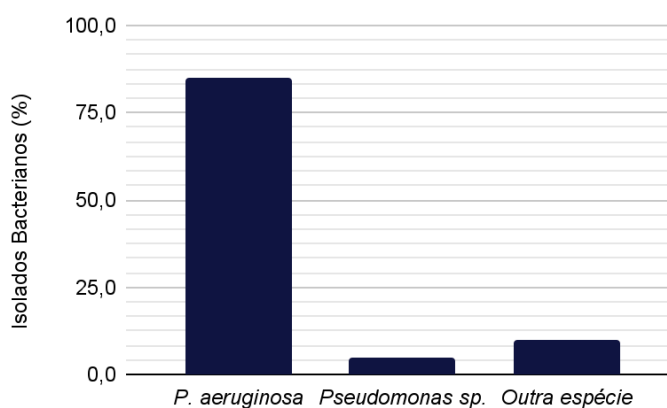
Assim como *A. baumannii*, *P. aeruginosa* também apresentou uma alta frequência dos isolados clínicos analisados neste estudo, 85%. A permanência da espécie em ambientes hospitalares advém da capacidade de formação de biofilmes, adaptabilidade aos

antimicrobianos, persistência ambiental e virulência, tornando-a um agente infeccioso recorrente em pacientes imunocomprometidos (Muddassir *et al.*, 2022; Farzin *et al.*, 2023).

Os isolados descritos como outras espécies não pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, representaram a segunda maior frequência encontrada. Essa identificação errada pode ser justificada pelo fato de que esses isolados foram recuperados em período anterior a 2023, quando o hospital de estudo utilizava bioquímica manual para identificação, e a partir de 2023, os demais foram identificados pelo sistema Vitek®, bioquímica automatizada.

A bioquímica automatizada aumenta a eficiência e exatidão da identificação, diminuindo os custos de manutenção, devido a computação associada a realização do processamento e análise. Enquanto isso, a manual depende exclusivamente da interpretação humana, o que pode justificar a prevalência de outras espécies encontradas e classificadas como *P. aeruginosa* no período anterior a 2023, sendo essas ocorrências não mais evidenciadas após esse período (Gherson *et al.*, 2000; Duggal *et al.*, 2012). De modo geral, foi possível observar que os isolados analisados de *Acinetobacter* sp. e *Pseudomonas* sp. de origem hospitalar demonstraram maior frequência das espécies *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, dentre o total de isolados bacterianos identificados pelas PCRs de identificação.

Gráfico 2. Frequência de *P. aeruginosa* nos isolados bacterianos de origem hospitalar identificados pelas técnicas de PCR uniplex.



Fonte: Autor (2024).

As espécies de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* compreendem as bactérias não fermentadoras mais frequentemente associadas às IRAS e contribuem para o aumento do custo de tratamento, menor qualidade e expectativa de vida, principalmente em pacientes imunocomprometidos (Leoncio *et.al*, 2019; Islam *et al.*, 2023). Tais espécies vêm sendo

frequentemente avaliadas quanto a sua frequência em ambientes hospitalares, como descrito nos estudos de Gholami *et al.* (2016) e Karah *et al.* (2011).

A alta frequência de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* observadas nos isolados analisados no decorrer dos anos pode ser atribuída ao aumento da resistência aos antimicrobianos e medidas de controle de infecções inadequadas aplicadas nos ambientes de assistência à saúde (Araya *et al.*, 2023). Em consonância, o evidente aumento dos isolados no ano de 2023, período pós-pandemia da COVID-19, sugere que o aumento do uso de antimicrobianos de amplo espectro durante a pandemia contribuiu para o aumento da frequência de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* resistentes entre os isolados bacterianos de origem hospitalar (Mączyńska *et al.*, 2023).

A pressão seletiva exercida pelos antimicrobianos, a colonização do hospedeiro e reservatórios em potencial encontrados nas instalações hospitalares contribuem para o aumento de isolados de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* ao decorrer dos anos; principalmente em UTIs (Adams *et al.*, 2019). As UTIs são frequentemente associadas à alta prevalência de patógenos. Uma pesquisa evidenciou que aproximadamente 55% dos pacientes em UTIs tiveram contato com pelo menos um patógeno multirresistente (Wu *et al.*, 2023), corroborando nossos achados cuja maioria dos isolados do estudo eram provenientes de pacientes internados neste setor.

Os diferentes resultados das identificações realizadas por provas bioquímicas e as baseadas em PCR para cada isolado bacteriano de origem hospitalar analisado pode ser observado na tabela 5. Onde para os isolados de *Acinetobacter* sp. foi constatado uma maior divergência dos resultados de identificação, enquanto que para os isolados de *Pseudomonas* sp. foi observado maior convergência entre os resultados de identificação.

Tabela 5. Comparação entre a identificação bioquímica e molecular baseada em PCR realizada nos isolados bacterianos de origem hospitalar estudados.

Isolados Bacterianos Recuperados	Identificação Bacteriana		Observação dos Resultados de Identificação Obtidos
	Fenotípica por provas bioquímicas	Molecular baseada em PCR	
13577	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>A. baumannii</i>	Divergência
7426	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>A. baumannii</i>	Divergência
14561	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>A. baumannii</i>	Divergência
14736	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>A. baumannii</i>	Divergência
14740	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>A. baumannii</i>	Divergência

17975	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>A. baumannii</i>	Divergência
17978	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>A. baumannii</i>	Divergência
18421	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>A. baumannii</i>	Divergência
18384	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>A. baumannii</i>	Divergência
18338	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>A. baumannii</i>	Divergência
21138	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Acinetobacter</i> sp.	Convergência
18582	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>A. baumannii</i>	Divergência
18583	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>A. baumannii</i>	Divergência
683	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>A. baumannii</i>	Divergência
22212	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>A. baumannii</i>	Divergência
22713	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>A. baumannii</i>	Divergência
10663	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>A. baumannii</i>	Divergência
10540	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>A. baumannii</i>	Divergência
10724	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>A. baumannii</i>	Divergência
11109	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>A. baumannii</i>	Divergência
10954	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>A. baumannii</i>	Divergência
21560	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>A. baumannii</i>	Divergência
21710	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>A. baumannii</i>	Divergência
22200	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>A. baumannii</i>	Divergência
22037	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>A. baumannii</i>	Divergência
22145	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>A. baumannii</i>	Divergência
22309	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>A. baumannii</i>	Divergência
22395	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>A. baumannii</i>	Divergência
22437	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>A. baumannii</i>	Divergência
22363	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>A. baumannii</i>	Divergência
21708	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>A. baumannii</i>	Divergência
24690	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>A. baumannii</i>	Divergência
12850	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	Convergência
12899	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	Convergência
25767	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>A. baumannii</i>	Divergência

24590	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>A. baumannii</i>	Divergência
25671	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	Convergência
25835	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>A. baumannii</i>	Divergência
25674	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	Convergência
6756	<i>P. aeruginosa</i>	Outra espécie	Divergência
13504	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Convergência
14734	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Convergência
14886	<i>P. aeruginosa</i>	Outra espécie	Divergência
14792	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Convergência
14933	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Convergência
17099	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	Divergência
17105	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Convergência
18492	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Convergência
18395	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Convergência
18342	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Convergência
18399	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Convergência
22259	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	Divergência
22271	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Convergência
22080	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Convergência
22124	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Convergência
22111	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Convergência
22845	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Convergência
21679	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Convergência
21693	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Convergência
22062	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Convergência
23636	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Convergência
22157	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Convergência
21771	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Convergência
22425	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Convergência
22269	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Convergência

22218	<i>P. aeruginosa</i>	Outra espécie	Divergência
21715	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Convergência
22126	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Convergência
22299	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Convergência
22843	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Convergência
21687	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Convergência
21762	<i>P. aeruginosa</i>	Outra espécie	Divergência
24978	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Convergência
LCR751	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Convergência
24677	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Convergência
25620	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Convergência
25654	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Convergência
25633	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Convergência
25655	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Convergência

Fonte: Autor (2024).

Metodologias de identificação bacteriana eficientes na microbiologia clínica são essenciais para promover um menor tempo de resposta, permitir uma tomada de decisão mais rápida, diminuindo o risco de vida em pacientes com infecção (Mauri *et al.*, 2017). Nesse sentido, técnicas como a PCR vêm sendo utilizadas para garantir um diagnóstico mais exato, a partir da rápida e precisa detecção dos patógenos (Zukowska, 2021).

As identificações baseadas em PCR apresentadas para a detecção de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* apresentaram ser mais eficientes quando comparadas às identificações bioquímicas previamente realizadas. A determinação do gene a ser amplificado na PCR de identificação exerce uma influência crucial na eficiência da técnica (Chakravorty *et al.*, 2006). A utilização do gene 16S rDNA é amplamente aplicada por promover uma rápida identificação, embora seja necessário a otimização dos oligonucleotídeos utilizados (Kai *et al.*, 2018).

A capacidade de diferenciação das espécies de *Pseudomonas* sp. evidenciada a partir do gene 16S rDNA advém da alta estabilidade genética, como observado por Ugo *et al.* (2024) ao investigar as linhagens nigerianas. Em adição, também é evidenciado a capacidade e utilização do gene na diferenciação e identificação de *P. aeruginosa* em diversas amostras,

incluindo clínicas, demonstrando a eficiência de detecção de *Pseudomonas* sp. (Saeed *et al.*, 2023; Moorlag *et al.*, 2023).

Em contrapartida, embora *A. baumannii* possa ser identificado pelo gene *bla*_{OXA-51-like}, intrínseco à espécie, outros genes como a região ITS e *recA* são utilizados para promover uma identificação mais precisa, evidenciado neste estudo. Tendo em vista que o gene codificador de carbapenemase pode ser encontrado em outras espécies de *Acinetobacter* sp. (Hamed *et al.*, 2023; Turton *et al.*, 2010).

A identificação por PCR multiplex utilizada a partir da amplificação desses genes garante uma maior exatidão e eficiência na detecção de *A. baumannii* entre isolados clínicos, como foi observado. A região ITS e o gene *recA* utilizados desempenham um papel crucial, pois permitem uma distinção eficiente, aumentando a sensibilidade e especificidade (Phan *et al.*, 2020). Por outro lado, a utilização do gene *recA*, associado a processos de reparação de DNA e a resistência, enfatiza sua importância para a virulência e permanência bacteriana sob estresse ambiental (Aranda *et al.*, 2011).

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os 80 isolados de *Acinetobacter* sp. e *Pseudomonas* sp. analisados pertencentes majoritariamente ao ano de 2023 mostraram maior frequência das espécies de *A. baumannii* e *P. aeruginosa*. Ambas espécies de interesse clínico, estando associadas aos ambientes hospitalares, principalmente a UTI, e ocorrências de IRAS. Os resultados do presente estudo corroboram com a utilização de métodos genotípicos para identificação, incluindo a identificação baseada em PCR com a amplificação dos genes 16S rDNA, região ITS e *recA*.

A PCR multiplex para os isolados de *Acinetobacter* sp. apresentou boa capacidade de diferenciação da espécie *A. baumannii* entre os isolados de forma mais exata quando comparada aos métodos bioquímicos convencionais, manual ou automatizado. De modo semelhante, as PCRs uniplex para identificação de *P. aeruginosa* apresentaram exatidão na detecção da espécie entre os isolados analisados. Ambas as PCRs de identificação das espécies apresentaram boa confiabilidade da identificação bacteriana, sem contraposições.

Em síntese, o presente estudo apresenta uma metodologia mais exata, podendo vir a auxiliar na realização do diagnóstico e promover um maior controle das IRAS. Resultando em uma maior segurança ao paciente, bem como na redução da ocorrência das infecções em ambientes de assistência à saúde.

REFERÊNCIAS

- ABDEL AZIZ, Mohamed et al. Strategic approach for the strengthening of laboratory services for tuberculosis control, 2006-2009. World Health Organization, 2006.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Programa Nacional de Prevenção e Controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (PNPCIRAS) 2021 a 2025. 2021.
- ALMEIDA, Lígia A.; ARAUJO, Ricardo. Highlights on molecular identification of closely related species. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 13, p. 67-75, 2013.
- AL-NAKKAS, Aref; MUSTAFA, Abu Salim; WRIGHT, Stephen G. Large-scale evaluation of a single-tube nested PCR for the laboratory diagnosis of human brucellosis in Kuwait. *Journal of medical microbiology*, v. 54, n. 8, p. 727-730, 2005.
- ALVIM, André Luiz Silva; COUTO, Bráulio Roberto Gonçalves Marinho; GAZZINELLI, Andrea. Perfil epidemiológico das infecções relacionadas à assistência à saúde causadas por Enterobactérias produtoras de Carbapenemase. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*, v. 53, p. e03474, 2019.
- ANTUNES, Luísa CS; VISCA, Paolo; TOWNER, Kevin J. *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. *Pathogens and disease*, v. 71, n. 3, p. 292-301, 2014.
- BALDWIN, Adam et al. Multilocus sequence typing scheme that provides both species and strain differentiation for the *Burkholderia cepacia* complex. *Journal of clinical microbiology*, v. 43, n. 9, p. 4665-4673, 2005.
- BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 5: Tecnologias em serviço da saúde: Descrição dos meios de cultura empregados nos exames microbiológicos/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2013.
- BROSCH, Roland et al. Genomic fingerprinting of 80 strains from the WHO multicenter international typing study of *Listeria monocytogenes* via pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). *International Journal of Food Microbiology*, v. 32, n. 3, p. 343-355, 1996.
- BURSLE, Evan; ROBSON, Jennifer. Non-culture methods for detecting infection. *Australian prescriber*, v. 39, n. 5, p. 171, 2016.
- Centers for Disease Control and Prevention (U.S.) (2019). Antibiotic resistance threats in the United States, 2019.
- Chang L, Hsiao C, Chen, et al Accuracy and comparison of two rapid multiplex PCR tests for gastroenteritis pathogens: a systematic review and metaanalysis. *BMJ Open Gastroenterology* 2021;8:e000553.

Chen TL, Siu LK, Wu RC, et al. Comparison of one-tube multiplex PCR, automated ribotyping and intergenic spacer (ITS) sequencing for rapid identification of *Acinetobacter baumannii*. Clin Microbiol Infect. 2007;13(8):801-806. doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01744.x

ÇOPUR ÇİÇEK, AYŞEGÜL et al. Screening of antimicrobial resistance genes and epidemiological features in hospital and community-associated carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. Infection and Drug Resistance, p. 1517-1526, 2021.

DAS NEVES, Yasmin Castillos de Ibrahim et al. Genotyping methods and their contributions to the study of tuberculosis dynamic in Latin America. The Journal of Infection in Developing Countries, v. 17, n. 10, p. 1373-1386, 2023.

DE OLIVEIRA, David MP et al. Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. Clinical microbiology reviews, v. 33, n. 3, p. 10.1128/cmr.00181-19, 2020.

DIANCOURT, Laure et al. The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. PloS one, v. 5, n. 4, p. e10034, 2010.

Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, Klapper PE. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. Clin Microbiol Rev. 2000 Oct;13(4):559-70.

EUZÉBY, J. List of prokaryotic names with standing in nomenclature. <http://www.bacterio.cict.fr>, 2009.

FEIL, Edward J.; SPRATT, Brian G. Recombination and the population structures of bacterial pathogens. Annual Reviews in Microbiology, v. 55, n. 1, p. 561-590, 2001.

FRANCO-DUARTE, R. et al. Alexandrino de Souza VC, Sharifi-Rad J, Coutinho HDM, Martins N, Rodrigues CF. Advances in chemical and biological methods to identify microorganisms-from past to present. Microorganisms, v. 7, n. 5, p. 130, 2019.

FREITAS, Carla; CAMARGO, Ilana Lopes Baratella da Cunha. Nota técnica conjunta CGLAB, BrCAST e ANVISA: testes de sensibilidade para *Acinetobacter* spp. 2021.

GIONO-CEREZO, Silvia et al. Antimicrobial resistance. Its importance and efforts to control it. Gaceta medica de Mexico, v. 156, n. 2, p. 172-180, 2020.

GOMILA, Margarita et al. Clarification of taxonomic status within the *Pseudomonas syringae* species group based on a phylogenomic analysis. Frontiers in microbiology, v. 8, p. 320397, 2017.

Guerra, Sarah Maria van Tol Amaral et al. Desenvolvimento de ensaio PCR Multiplex para detecção e diferenciação de agentes etiológicos-Revisão de literatura. 2022.

GURTLE, Volker et al. The use of recombined ribosomal RNA operon (rrn) type-specific flanking genes to investigate rrn differences between *Vibrio parahaemolyticus* environmental and clinical strains. *Gene Reports*, v. 4, p. 16-25, 2016.

HIGGINS, Paul G. et al. Inclusion of OXA-143 primers in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 35, n. 3, 2010.

HOWARD, Aoife et al. *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen. *Virulence*, v. 3, n. 3, p. 243-250, 2012.

HU, Shuqian et al. Species-specific identification of *Pseudomonas* based on 16S–23S rRNA gene internal transcribed spacer (ITS) and its combined application with next-generation sequencing. *BMC microbiology*, v. 22, n. 1, p. 188, 2022.

OLIVEIRA, Roselaine Maria Coelho et al. Estimating the savings of a national project to prevent healthcare-associated infections in intensive care units. *Journal of Hospital Infection*, v. 143, p. 8-17, 2024.

KIFFER, Carlos RV et al. Exploratory model for estimating occupation-day costs associated to Hospital Related Infections based on data from national prevalence project: IRAS Brasil Project. *Journal of Infection Control*, v. 4, n. 1, p. 30-33, 2015.

Koneman, E. W.; Allen, S. D.; Janda, W. M.; Schreckenberger, P. C.; Winn Jr, W. C. *Diagnóstico microbiológico: Texto e atlas colorido*. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

LEAL, Michelle Araujo; FREITAS-VILELA, Ana Amélia de. Custos das infecções relacionadas à assistência em saúde em uma Unidade de Terapia Intensiva. *Revista Brasileira de Enfermagem*, v. 74, p. e20200275, 2021.

LELLOUCHE, Jonathan et al. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrier detection: a simple and efficient protocol. *Microbiology Spectrum*, p. e04062-23, 2024.

LEONCIO, Jackeline Martins et al. Impacto das infecções relacionadas à assistência à saúde nos custos da hospitalização de crianças. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*, v. 53, p. e03486, 2019.

LORENZO, Víctor de. *Pseudomonas aeruginosa: the making of a pathogen*. 2014.

MARCHAIM, Dror et al. Surveillance cultures and duration of carriage of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of clinical microbiology*, v. 45, n. 5, p. 1551-1555, 2007.

Markoulatos P, Siafakas N, Moncany M. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *J Clin Lab Anal*. 2002;16(1):47-51.

MATAR, Ghassan M. *Pseudomonas* and *Acinetobacter*: From drug resistance to pathogenesis. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 8, p. 68, 2018.

MIELKO, Karolina Anna et al. Metabolomic studies of *Pseudomonas aeruginosa*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 35, p. 1-11, 2019.

MUSTAFA, A. S. et al. Establishment and evaluation of a multiplex polymerase chain reaction for detection of mycobacteria and specific identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Tubercle and Lung Disease*, v. 76, n. 4, p. 336-343, 1995.

MUSTAFA, Abu Salim. *Whole Genome Sequencing: Applications in Clinical Bacteriology*. 2024.

NEVES, Patrícia R. et al. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 47, p. 409-420, 2011.

NIKEL, Pablo I.; DE LORENZO, Víctor. *Pseudomonas putida* as a functional chassis for industrial biocatalysis: from native biochemistry to trans-metabolism. *Metabolic engineering*, v. 50, p. 142-155, 2018.

PELEG, Anton Y.; SEIFERT, Harald; PATERSON, David L. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clinical microbiology reviews*, v. 21, n. 3, p. 538-582, 2008.

PRUDEN, Amy et al. Seizing the moment: now is the time for integrated global surveillance of antimicrobial resistance in wastewater environments. *Current Opinion in Microbiology*, v. 64, p. 91-99, 2021.

Public Health England. *UK Standards for Microbiology Investigations. Identification of Pseudomonas species and other Non-Glucose Fermenters*. 2015.

RIBEIRO, Sthefanie da Silva et al. *Padronização de PCR em Tempo Real para detecção de carbapenemases dos tipos KPC e NDM produzidas por bactérias Gram negativas*. 2016. Dissertação de Mestrado.

SANTOS, Ingrid de Arruda Lucena et al. *Mecanismos de resistência antimicrobiana em Pseudomonas aeruginosa*. 2015.

SCHMITZ, Jonathan E. et al. Forty years of molecular diagnostics for infectious diseases. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 60, n. 10, p. e02446-21, 2022.

SLATKO, Barton E.; GARDNER, Andrew F.; AUSUBEL, Frederick M. Overview of next-generation sequencing technologies. *Current protocols in molecular biology*, v. 122, n. 1, p. e59, 2018.

Snelling AM, Gerner-Smidt P, Hawkey PM, et al. Validation of use of whole-cell repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR (REP-PCR) for typing strains belonging to the

Acinetobacter calcoaceticus-*Acinetobacter baumannii* complex and application of the method to the investigation of a hospital outbreak. *J Clin Microbiol.* 1996;34(5):1193-1202. doi:10.1128/jcm.34.5.1193-1202.1996

Spilker T, Coenye T, Vandamme P, LiPuma JJ. PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol.* 2004 May;42(5):2074-9. doi: 10.1128/JCM.42.5.2074-2079.2004. PMID: 15131172; PMCID: PMC404678.

STANBRO, Josh et al. Topical delivery of *Lactobacillus* culture supernatant increases survival and wound resolution in traumatic *Acinetobacter baumannii* infections. *Probiotics and antimicrobial proteins*, v. 12, p. 809-818, 2020.

STORR, Julie et al. Core components for effective infection prevention and control programmes: new WHO evidence-based recommendations. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, v. 6, p. 1-18, 2017.

TORTORA, Gerard J.; CASE, Christine L.; FUNKE, Berdell R. *Microbiologia-12ª Edição*. Artmed Editora, 2016.

VALCEK, Adam et al. Acinetobase: the comprehensive database and repository of *Acinetobacter* strains. *Database*, v. 2022, p. baac099, 2022.

VAN DESSEL, Helke et al. Identification of a new geographically widespread multiresistant *Acinetobacter baumannii* clone from European hospitals. *Research in microbiology*, v. 155, n. 2, p. 105-112, 2004.

VAN EL, Carla G. et al. Whole-genome sequencing in health care. *European Journal of Human Genetics*, v. 21, n. 6, p. 580-584, 2013.

VERMA, Privita; TIWARI, Monalisa; TIWARI, Vishvanath. Efflux pumps in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: Current status and challenges in the discovery of efflux pumps inhibitors. *Microbial pathogenesis*, v. 152, p. 104766, 2021.

WISPLINGHOFF, Hilmar et al. Nosocomial bloodstream infections due to *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter pittii* and *Acinetobacter nosocomialis* in the United States. *Journal of Infection*, v. 64, n. 3, p. 282-290, 2012.

ZHEN, Xuemei et al. Economic burden of antibiotic resistance in ESKAPE organisms: a systematic review. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, v. 8, p. 1-23, 2019.

HESSE, Wolfgang; GRÖSCHEL, D. H. M. Walther and Angelina Hesse-early contributors to bacteriology. *ASM news*, v. 58, n. 8, p. 425-428, 1992.

PETRI, R. J. A minor modification of the plating technique of Koch. *Centralbl Bacteriol Parasitenkunde*, v. 1, p. 279-280, 1887.

BONNET, Maryline et al. Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. *New microbes and new infections*, v. 34, p. 100622, 2020.

JANDA, J. Michael; ABBOTT, Sharon L. Bacterial identification for publication: when is enough enough?. *Journal of clinical microbiology*, v. 40, n. 6, p. 1887-1891, 2002.

ARBEFEVILLE, Sophie S.; TIMBROOK, Tristan T.; GARNER, Cherilyn D. Evolving strategies in microbe identification—a comprehensive review of biochemical, MALDI-TOF MS and molecular testing methods. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 79, n. Supplement_1, p. i2-i8, 2024.

KLINGLER, J. M. et al. Evaluation of the Biolog automated microbial identification system. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 58, n. 6, p. 2089-2092, 1992.

BUSZEWSKI, Bogusław et al. Identification of microorganisms by modern analytical techniques. *Journal of AOAC International*, v. 100, n. 6, p. 1607-1623, 2017.

MULLIS, Kary B.; FALOONA, Fred A. [21] Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. In: *Methods in enzymology*. Academic Press, 1987. p. 335-350.

ZHU, Hanliang et al. PCR past, present and future. *Biotechniques*, v. 69, n. 4, p. 317-325, 2020.

ALBERTS, Bruce et al. *Biologia molecular da célula*. Artmed Editora, 2017.

LEHMAN, I. R. Discovery of DNA polymerase. *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 37, p. 34733-34738, 2003.

WATSON, James D.; CRICK, Francis HC. The structure of DNA. In: *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1953. p. 123-131.

ANALYTICAL METHODS COMMITTEE. PCR – the polymerase chain reaction. *Analytical Methods*, n. 59, p. 333-336, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1039/c3ay90101g>. Acesso em: 12 out. 2024.

VOET, Donald; VOET, Judith G.; PRATT, Charlotte W. *Fundamentos de Bioquímica: A Vida em Nível Molecular*. Artmed Editora, 2014.

RELLER, L. Barth; WEINSTEIN, Melvin P.; PETTI, Cathy A. Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. *Clinical infectious diseases*, v. 44, n. 8, p. 1108-1114, 2007.

BOU, Germán et al. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, v. 29, n. 8, p. 601-608, 2011.

BOCHNER, Barry R. Global phenotypic characterization of bacteria. *FEMS microbiology reviews*, v. 33, n. 1, p. 191-205, 2008.

GEORGHIOU, Paul R. et al. Molecular epidemiology of infections due to *Enterobacter aerogenes*: identification of hospital outbreak-associated strains by molecular techniques. *Clinical infectious diseases*, v. 20, n. 1, p. 84-94, 1995.

SÁNCHEZ, Gildardo Rivera et al. Identification and typing methods for the study of bacterial infections: a brief review and mycobacterial as case of study, 2015.

GHOLAMI, A. et al. PCR-based assay for the rapid and precise distinction of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from burns patients. *Journal of preventive medicine and hygiene*, v. 57, n. 2, p. E81, 2016.

KARAH, Nabil et al. Species identification and molecular characterization of *Acinetobacter* spp. blood culture isolates from Norway. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, v. 66, n. 4, p. 738-744, 2011.

VILLALÓN, Pilar et al. Dynamics of a sporadic nosocomial *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* complex population. *Frontiers in microbiology*, v. 10, p. 593, 2019.

ARAYA, Shambel et al. Epidemiology and multidrug resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from clinical samples in Ethiopia. *Infection and Drug Resistance*, p. 2765-2773, 2023.

MACZYŃSKA, Beata et al. Changes in antibiotic resistance of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in a multi-profile hospital in years 2017–2022 in Wrocław, Poland. *Journal of Clinical Medicine*, v. 12, n. 15, p. 5020, 2023.

ADAMS, Mark D. et al. Rapid replacement of *Acinetobacter baumannii* strains accompanied by changes in lipooligosaccharide loci and resistance gene repertoire. *MBio*, v. 10, n. 2, p. 10.1128/mbio.00356-19, 2019.

WU, Cuiyun et al. Tracking epidemiological characteristics and risk factors of multi-drug resistant bacteria in intensive care units. *Infection and Drug Resistance*, p. 1499-1509, 2023.

GOLLI, Andreea-Loredana et al. Prevalence of multidrug-resistant pathogens causing bloodstream infections in an intensive care unit. *Infection and Drug Resistance*, p. 5981-5992, 2022.

SALAM, Md Tahsin et al. Emergence of antibiotic-resistant infections in ICU patients. *Journal of Angiotherapy*, v. 8, n. 5, p. 1-9, 2024.

MIGLIACCIO, Antonella et al. Phylogenomics of *Acinetobacter* species and analysis of antimicrobial resistance genes. *Frontiers in Microbiology*, v. 14, p. 1264030, 2023.

TAUDIEN, Stefan; CHILTON, Paul; WIGGINS, Hazel; MARTINEZ, Ana. Misidentification as *Pseudomonas aeruginosa* in hospital water supply samples. *Journal of Hospital Infection*, v. 133, p. 23-27, 2023.

MORI, Takeo et al. *Pseudomonas* otitis bacteremia in an immunocompromised patient with cellulitis: case report and literature review. *BMC Infectious Diseases*, v. 23, n. 1, p. 883, 2023.

JEONG, Seri; BAE, Ik-Soo; LEE, Young; JEON, Han-Sol; SONG, Sang-Ho; KWON, Kye-Hyun; SHIN, Ji-Hyun. Identification of *Acinetobacter* species using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Annals of Laboratory Medicine*, v. 36, n. 4, p. 325, 2016.

KARAH, Nabil; HAUGAN, Morten Sigvart; TJØNNFJORD, Ellen; URSINUS, Claas. Species identification and molecular characterization of *Acinetobacter* spp. blood culture isolates from Norway. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 66, n. 4, p. 738-744, 2011.

LUCIDI, Massimiliano; BONCHI, Carlo; TRIPODI, Laura; ZINZI, Michele. Pathogenicity and virulence of *Acinetobacter baumannii*: Factors contributing to the fitness in healthcare settings and the infected host. *Virulence*, v. 15, n. 1, p. 2289769, 2024.

AL ATROUNI, Ahmad; TAWIL, Nidal; HRAOUI-BLOUZ, Andrée; DAOUD, Zeina. Diversity of *Acinetobacter* species isolated from different environments in Lebanon: a nationwide study. *Future Microbiology*, v. 11, n. 9, p. 1147-1156, 2016.

MUDDASSIR, Maria; AHMAD, Aftab; KHAN, Sanaullah; SAEED, Muhammad Taha. Prevalence of multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa* in healthcare facilities. *Pakistan Journal of Medical & Health Sciences*, v. 16, n. 09, p. 5-5, 2022.

FARZIN, Anika; RAHMAN, Md Mizanur; MOLLIKA, Ferdows Ara. *Pseudomonas aeruginosa*: the alarming pathogen of hospital acquired infection. 2023.

GHERSON, Paul; JAMES, Laurence F.; RICHARDS, Alan T.; MORGAN, Sophie. Automated instrumentation, clinical chemistry. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 2000.

DUGGAL, Shalini; KUMAR, Anil; LAAL, Tanuja; SINGH, Ragini. Comparison of an automated system with conventional identification and antimicrobial susceptibility testing. *International Scholarly Research Notices*, v. 2012, n. 1, p. 107203, 2012.

MAURI, Carola et al. Identification by mass spectrometry and automated susceptibility testing from positive bottles: a simple, rapid, and standardized approach to reduce the turnaround time in the management of blood cultures. *BMC Infectious Diseases*, v. 17, p. 1-8, 2017.

ZUKOWSKA, M. E. Advanced methods of bacteriological identification in a clinical microbiology laboratory. *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research*, v. 15, n. 2, 2021.

CHAKRAVORTY, Soumitesh et al. PCR amplification of shorter fragments from the *devR* (*Rv3133c*) gene significantly increases the sensitivity of tuberculosis diagnosis. *FEMS microbiology letters*, v. 257, n. 2, p. 306-311, 2006.

KAI, Shinichi et al. Direct PCR amplification of 16S rRNA genes offers accelerated bacterial identification using the MinION™ nanopore sequencer. *bioRxiv*, p. 435859, 2018.

UGO, Udochi Anayo et al. Phylogenetic analysis on 16S rRNA of *Pseudomonas* Species isolated from clinical specimens in Nigeria and other Regions. *Open Access Research Journal of Biology and Pharmacy*, v. 11, n. 1, p. 013-030, 2024.

SAEED, A. A.; MAYEA, K. Q.; SHALAL, S. H. Molecular identification and sequencing of *Pseudomonas aeruginosa* 16S rRNA gene isolated from a variety of raw cow milk samples in Iraq. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, v. 74, n. 1, p. 5235-5240, 2023.

MOORLAG, Simone JCFM et al. Targeting the 16S rRNA gene by reverse complement PCR next-generation sequencing: specific and sensitive detection and identification of microbes directly in clinical samples. *Microbiology Spectrum*, v. 11, n. 3, p. e04483-22, 2023.

BARAKA, Adam et al. An *Acinetobacter non-baumannii* population study: antimicrobial resistance genes (ARGs). *Antibiotics*, v. 10, n. 1, p. 16, 2020.

TURTON, Jane F. et al. Incidence of *Acinetobacter* species other than *A. baumannii* among clinical isolates of *Acinetobacter*: evidence for emerging species. *Journal of clinical microbiology*, v. 48, n. 4, p. 1445-1449, 2010.

HENRIKSEN, S. D. Chapter I Serotyping of bacteria. In: *Methods in microbiology*. Academic Press, 1978. p. 1-13.

CHANG, Ming-Mei. Plasmid-to-plasmid Southern blot analysis validates the presence of nucleotide binding site (nbs) sequences in cloned plasmids. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, v. 50, n. 4, p. 373-380, 2022.

HAMED, Samira M. et al. *Acinetobacter baumannii* global clone-specific resistomes explored in clinical isolates recovered from Egypt. *Antibiotics*, v. 12, n. 7, p. 1149, 2023.

CASON, Carolina et al. Next-generation sequencing and PCR technologies in monitoring the hospital microbiome and its drug resistance. *Frontiers in microbiology*, v. 13, p. 969863, 2022.

PHAN-CANH, Trinh et al. Identification of *Acinetobacter baumannii* and detection of β -lactam antibiotic resistance genes in clinical samples by multiplex PCR. *bioRxiv*, p. 2020.10.25.353896, 2020.

ARANDA, Jesús et al. *Acinetobacter baumannii* RecA protein in repair of DNA damage, antimicrobial resistance, general stress response, and virulence. *Journal of bacteriology*, v. 193, n. 15, p. 3740-3747, 2011.