



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO

PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

DEPARTAMENTO BIOCÊNCIAS

CURSO DE BIOTECNOLOGIA

VICTÓRIA KÉSSIA SILVA ARAÚJO

**DETECÇÃO FENOTÍPICA DE CARBAPENEMASES EM ISOLADOS CLÍNICO DE
Acinetobacter baumannii DE ORIGEM HOSPITALAR**

MOSSORÓ, 2023

VICTÓRIA KÉSSIA SILVA ARAÚJO

**DETECÇÃO FENOTÍPICA DE CARBAPENEMASES EM ISOLADOS CLÍNICO DE
Acinetobacter baumannii DE ORIGEM HOSPITALAR**

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

Orientador: Prof. Dr. Caio Augusto
Martins Aires

MOSSORÓ, 2023

© 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.

SA663 Silva Araújo, Victória Késsia.
d DETECÇÃO FENOTÍPICA DE CARBAPENEMASES EM
ISOLADOS CLÍNICO DE *Acinetobacter baumannii* DE
ORIGEM HOSPITALAR / Victória Késsia Silva Araújo. -
2023.
52 f. : il.

Orientador: Caio Augusto Martins Aires.
Coorientador: Caio Augusto Martins Aires.
Monografia (graduação) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Curso de Biotecnologia,
2023.

1. Multiresistência. 2. *A.baumannii*. 3.
Carbapenêmicos. 4. Carbapenemases. 5. Testes
fenotípicos. I. Martins Aires, Caio Augusto,
orient. II. Martins Aires, Caio Augusto, co-
orient. III. 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.

VICTÓRIA KÉSSIA SILVA ARAÚJO

**DETECÇÃO FENOTÍPICA DE CARBAPENEMASES EM ISOLADOS CLÍNICO DE
Acinetobacter baumannii DE ORIGEM HOSPITALAR**

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

Defendida em: 26 / 05 / 2023.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Emmanuel de Sousa Jereissati (UFERSA)
Membro Examinador

Profa. Dra. Lara Barbosa Souza (MEMBRO EXTERNO)
Membro Examinador

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, autor do universo assim como da minha jornada enquanto por aqui estiver, por me guiar no caminho do meu propósito, concedendo a sabedoria e a perseverança necessária para alcançar nossos objetivos, bem como amparo e força diante das dificuldades.

Agradeço a minha família, fiéis torcedores do meu sucesso, por serem a base de todas as minhas conquistas, e moldarem meu caráter através de valores que guiaram todas as minhas escolhas e rumos, me permitindo chegar até aqui. Em especial aos meus pais, Andréa Araújo e Marcus Araújo, meus maiores exemplos, que sempre enxergaram na educação a ferramenta para transformar nossas vidas, e através de seu altruísmo nunca mediram esforços para que eu pudesse realizar meus sonhos. A minha irmã, Vívyna Araújo, minha fonte de alegria, inspiração e amor incondicional para toda minha vida. Aos meus avós maternos, Ivan e Sandra, agricultores, que na sua simplicidade puderam me ensinar o que há de mais importante para se aprender nessa vida. Aos meus avós paternos José Maria e Raimunda, por todo carinho que sempre me deram.

A Romontieso Silva e Vanusa Lima, por todos os conselhos, sempre me estimulando a ser minha melhor versão.

Ao meu companheiro Gabriel Moreira, por sempre me incentivar e acreditar no meu potencial, tornando os dias difíceis mais leves através da sua gentileza, compreensão e cuidado.

Aos meus amigos de infância, Dayane Leite e Kaio Rebouças, pessoas que tenho um carinho imenso e sou grata por estarem na minha vida compartilhando momentos incríveis ao longo dos anos.

Aos meus animais de estimação, por alegrarem meus dias e serem sempre tão empáticos, especialmente ao meu gatinho Cuca, que é minha companhia em Mossoró.

A todos os professores que tive ao longo da minha vida, desde o jardim de infância até a graduação, profissionais que foram de fundamental importância para minha formação como cidadã. Em especial a Professora Francisca Andrea Silva Araújo, por ser minha maior fonte de inspiração, e ao Professor e Orientador Caio Augusto Martins Aires, por toda paciência, ensinamentos e a oportunidade de realizar esse projeto.

Ao Laboratório de Microbiologia Clínica da UFERSA, por toda estrutura e espaço cedido, em especial aos meus colegas de estágio Laís Pontes e Sérvulo Carvalho e Marcileide por todas as risadas e conhecimentos compartilhados.

Aos colegas de graduação, por todos os momentos de descontração proporcionados.

A todos que não foram citados, mas contribuíram de alguma forma para que eu pudesse chegar ao fim dessa jornada, compartilho a alegria dessa conquista.

Por muitas vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.

Madre Teresa de Calcuta

RESUMO

Introdução: As bactérias vêm desenvolvendo mecanismos de resistência aos antimicrobianos cada vez mais eficientes, essa capacidade pode ser atribuída à pressão seletiva causada pela administração inadequada de antimicrobianos atrelada a capacidade desses microrganismos adquirirem diversos mecanismos de resistência, diminuindo gradualmente o número de fármacos disponíveis para tratar essas infecções. Citando caso, *Acinetobacter baumannii* é uma bactéria gram-negativa que possui notável capacidade de adquirir resistência microbiana, inclusive aos carbapenêmicos, considerados antibióticos de último recurso para tratamento de infecções multirresistentes. O fato de *A. baumannii* adaptar-se a situações extremas torna a situação ainda mais preocupante, sendo uma causa frequente de infecções associadas à assistência à saúde (IRAS). **Objetivo:** O objetivo desse estudo concentra-se em realizar a detecção fenotípica de carbapenemases em isolados de *A. baumannii* multirresistentes oriundos de amostras clínicas de pacientes hospitalizados. **Metodologia:** Foram testados 30 isolados, obtidos de pacientes internados em um hospital público localizado no município de Mossoro-RN. Esses isolados foram processados e crescidos em ágar sangue durante o período de 24 horas a 37°C, posteriormente, com objetivo de avaliar a possível produção de carbapenemase, foram executados os testes Modified Carbapenem Inactivation Method (mCIM), EDTA-Carbapenem Inactivation Method (eCIM) e Simplified Carbapenem Inactivation Method (sCIM). **Resultados:** Cerca de 97% testou positivo para a produção de carbapenemase em pelo menos um dos testes. Apenas 03 e 02 isolados testaram positivo para mCIM e eCIM, respectivamente, comprovando a baixa eficiência destes testes em isolados de *A. baumannii*. No entanto, quando submetidos aos testes de sCIM, 26 dos 30 isolados testaram positivo, sugerindo produção de carbapenemases. Os resultados mostraram-se discrepantes em 100% dos testes quando comparou-se mCIM/eCIM com sCIM. **Conclusão:** A resistência aos carbapenêmicos na população estudada é mediada principalmente, pela produção de carbapenemases, evidenciado pelo teste sCIM que se mostrou mais eficiente nesta espécie, além de ser de fácil e rápida execução e de baixo custo. No entanto, o fato de sCIM não diferenciar as classes de carbapenemases demonstra certa limitação na sua utilização, necessitando de outras metodologias complementares.

Palavras-chave: Multiresistência; *A. baumannii*; Carbapenêmicos; Carbapenemases; Testes fenotípicos.

ABSTRACT

Introduction: Bacteria have been developing increasingly efficient antimicrobial resistance mechanisms, this ability can be attributed to the selective pressure caused by inadequate administration of antimicrobials linked to the ability of these microorganisms to acquire various resistance mechanisms, gradually reducing the number of drugs available to treat these infections. Citing one case, *Acinetobacter baumannii* is a gram-negative bacterium that has a remarkable ability to acquire microbial resistance, including carbapenems, considered last resort antibiotics for the treatment of multidrug-resistant infections. The fact that *A. baumannii* adapts to extreme situations makes the situation even more worrying, being a frequent cause of healthcare-associated infections (HAIs). **Objective:** The objective of this study focuses on performing the phenotypic detection of carbapenemases in multiresistant *A. baumannii* isolates from clinical samples of hospitalized patients. **Methodology:** 30 isolates were tested, obtained from patients admitted to a public hospital located in the city of Mossoro-RN. These isolates were processed and grown on blood agar for a period of 24 hours at 37°C, subsequently, with the aim of evaluating the possible production of carbapenemase, the Modified Carbapenem Inactivation Method (mCIM), EDTA-Carbapenem Inactivation Method (eCIM), and Simplified Carbapenem Inactivation Method (sCIM) tests were performed. **Results:** About 97% tested positive for carbapenemase production in at least one of the tests. Only 03 and 02 isolates tested positive for mCIM and eCIM, respectively, proving the low efficiency of these tests in *A. baumannii* isolates. However, when subjected to sCIM tests, 26 of the 30 isolates tested positive, suggesting production of carbapenemases. The results were discrepant in 100% of the tests when comparing mCIM/eCIM with sCIM. **Conclusion:** The resistance to carbapenems in the studied population is mainly mediated by the production of carbapenemases, evidenced by the sCIM test, which proved to be more efficient in this species, in addition to being easy and quick to perform and of low cost. However, the fact that sCIM does not differentiate the classes of carbapenemases demonstrates a certain limitation in its use, requiring other complementary methodologies.

Keywords: Multiresistance; *A. baumannii*; Carbapenems; Carbapenemases; Phenotypic tests.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	–	Estruturas genéricas de β -lactâmicos.....	21
Figura 2	–	Classificação funcional e molecular das β -lactamase.....	23
Figura 3	–	Fluxograma das etapas do teste mCIM.....	33
Figura 4	–	Fluxograma das etapas do teste eCIM.....	34
Figura 5	–	Fluxograma das etapas do teste sCIM.....	35
Figura 6	–	Resultados e interpretação dos testes mCIM, eCIM e sCIM.....	35

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	–	Porcentagem de resultados positivos em cada teste fenotípico	40
-----------	---	--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	–	Dados referentes aos isolados testados	36
Tabela 2	–	Resultados de sCIM de cada isolado testado	37
Tabela 3	–	Resultados de mCIM e eCIM de cada isolado testado.....	38
Tabela 4	–	Comparação dos resultados dos três testes fenotípicos.....	39
Tabela 5	–	Comparação entre as despesas dos três testes fenotípicos	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MDR	Multirresistente
CIM	Método de inativação do carbapenêmico
DHP1	Desidropeptidase
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ESBL	β -lactamases de Espectro Estendido
IRAS	Infeções Relacionadas a Assistência á Saúde
MBL	Metalo β -lactamases
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBP	Proteína Ligante de Penicilina
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
XDR	Extensivo Resistente a Drogas
PDR	Pandroga Resistente
ABC	Superfamília Cassete de Ligação ATP
MFS	Superfamília dos Facilitadores Principais
SMR	Família de Baixa Resistência a Multidrogas
RND	Família Resistência-Nodulação-Divisão
MATE	Família de Extensão de Multidrogas e Compostos Tóxicos
THM	Teste de Hodge Modificado
ATCC	American Type Culture Collection
PH	Potencial Hidrogeniônico
KPC	Klebsiella Pneumoniae Carbapenemase
OXA	Oxacilinas
TSB	Tryptic Soy Broth
CLSI	Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais
SCIM	Método Simplificado de Inativação do Carbapenêmico
MCIM	Método de Inativação do Carbapenêmico Modificado
ECIM	Método de Inativação do Carbapenêmico Modificado por EDTA

LISTA DE SÍMBOLOS

β	Letra do alfabeto Grego correspondente a B no alfabeto Latino
μg	Microgramas
μl	Microlitros
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	17
2.1 Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde	17
2.2 Importância Clínica de <i>A. baumannii</i>	18
2.3 Carbapenêmicos.....	19
2.5 Resistência aos carbapenêmicos em <i>A. baumannii</i>	24
2.6 Detecção de Carbapenemases em <i>A. baumannii</i>	25
2.6.1 Métodos Fenotípicos.....	26
3. OBJETIVOS	29
3.1 Objetivo geral	29
3.2 Objetivos específicos	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 Área e Local do Estudo.....	30
4.2 População do Estudo.....	30
4.3 Desenho do estudo	30
4.4 Coleta de dados.....	30
4.5 Coleta das amostras	30
4.6 Procedimento padrão de processamento e conservação dos isolados bacterianos.....	31
4.7 Testes fenotípicos	31
4.7.1 Teste modified carbapenem inactivation method (mCIM)	32
4.7.2 Teste carbapenem inactivation method (eCIM)	33
4.7.3 Teste simplified carbapenem inactivation method (sCIM)	34
5. RESULTADOS	36
6. DISCUSSÃO	41
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
REFERÊNCIAS	46

1. INTRODUÇÃO

Bactérias pertencentes ao gênero *Acinetobacter* spp. encontram-se amplamente distribuídas na natureza, em linhas gerais, são cocobacilos Gram-negativos, estritamente aeróbicos, não moveis, não fermentativos de glicose, com a reação de oxidase negativa e catalase positiva, além de não exigentes (LEE et al., 2017). A maioria são considerados patógeno de baixo grau e virulência, porém a capacidade de causar infecções nosocomiais em pacientes imunocomprometidos e neutropênicos, associado ao fato de estarem se tornando progressivamente mais resistentes às drogas, o transformou em uma ameaça global e motivo de grande preocupação para a comunidade científica (BRADY; JAMAL; PERVIN, 2019).

A espécie de *Acinetobacter* mais relevante e clinicamente caracterizada é *A. baumannii*, classificado como um Gram-negativo capaz de causar infecções, principalmente nosocomiais graves e invasivas, associadas a altas taxas de mortalidade, representado uma ameaça à saúde pública. Mais comumente, as infecções manifestam-se como pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) em unidades de terapia intensiva (UTI) entre indivíduos imunocomprometidos, causando internação hospitalar prolongada (KYRIAKIDIS et al., 2021) ou infecções da corrente sanguínea associadas a cateter central. As taxas de mortalidade nesses casos podem chegar a 70% a 40%, respectivamente (IBRAHIM et al., 2021). Menos frequentemente, causa infecções na pele, tecidos moles e em locais cirúrgicos, bem como infecções do trato urinário associadas a cateteres (WEINER et al., 2016).

Na última década a regularidade das infecções hospitalares aumentou substancialmente, os surtos de infecção são repetidamente associados à microrganismos resistentes a múltiplas drogas (ANTUNES et al., 2014). Descrevendo em números o papel de *A. baumannii* nesse cenário, uma análise em escala global, demonstra que aproximadamente 45% de todos os isolados de *A. baumannii* são considerados multirresistentes (MDR), a maior parte concentra-se na América Latina e Oriente Médio, com taxas de 70%. Esses números de MDR são quase quatro vezes maiores do que os observadas para outros patógenos Gram-negativos, como *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*, por exemplo (GIAMMANCO et al., 2017).

As infecções causadas por essas cepas resistentes são tratadas, geralmente com carbapenêmicos, considerados antimicrobianos de último recurso. No entanto, o uso generalizado desses β -lactâmicos nessas infecções e o surgimento de mecanismos que conferem resistência aos carbapenêmicos, incluindo o recente surgimento de cepas resistentes a todos os antibióticos disponíveis, vem limitando a eficácia dessa droga (IBRAHIM et al., 2021; ANTUNES et al., 2014).

Vários mecanismos de resistência, incluindo β -lactamases, bombas de efluxo, defeitos

de permeabilidade e modificações de locais-alvo são detectados em *A. baumannii* (LEE et al., 2017). O mecanismo mais comum de resistência aos antibióticos β -lactâmicos é sua hidrólise enzimática mediada por β -lactamases, que são divididas em 4 classes, A, B, C e D, sendo as enzimas do tipo OXA (classe D), as mais comuns em cepas de *A. baumannii* (RAMIREZ; BONOMO; TOLMASKY, 2020).

Devemos levar em consideração que após a introdução de um patógeno multirresistente no ambiente hospitalar, sobretudo em unidades de terapia intensiva (UTI), a erradicação completa nem sempre é possível, frequentemente resultando em níveis endêmicos do microrganismo (ROESCH, 2017), fato este que levou o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) a classifica-lo como uma ameaça séria a saúde pública, evidenciando a necessidade de um monitoramento contínuo e incentivo as atividades de prevenção (CDC, 2019), a identificação de pacientes portadores de *A. baumannii* multirresistente pode servir tanto como marcador para o desenvolvimento de infecções clínicas subsequentes como para identificar potenciais transmissores desta bactéria a outros pacientes (ROESCH, 2017).

Ensaio genotípicos para a detecção de genes de carbapenemases (como PCR e testes de DNA microarray) são limitados em seu escopo porque apenas alvos conhecidos são detectados e mutações dentro desses alvos podem comprometer o desempenho do ensaio. Além disso, esses métodos moleculares são caros, demorados e requerem equipamentos e conhecimentos específicos para serem executados (PIERCE et al. 2017). Como alternativa a essas questões, vários métodos de detecção fenotípica com sensibilidade e especificidade diferentes foram desenvolvidos para detectar a presença dessas enzimas, entre eles o método de inativação de carbapenem (CIM).

O presente estudo tem como objetivo, detectar a produção de enzimas carbapenemases em *A. baumannii* multirresistente isolados de pacientes internados em um hospital público localizado no município de Mossoró-RN, através dos testes fenotípicos de fácil e rápida execução e custo reduzido.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde

Infecção hospitalar, também denominada institucional ou nosocomial, é qualquer infecção adquirida após a internação de um paciente em um hospital, e pode se manifestar durante esse período ou após a alta, desde que possa ser relacionada com a hospitalização. Essas infecções aparecem pela primeira vez 48 horas ou mais após a hospitalização ou até 30 dias após o recebimento de cuidados de saúde. Sua origem pode ser endógena, quando a microbiota do paciente é a causadora, ou exógena, quando a origem vem de fontes externas ao paciente. Nos últimos anos, o termo “Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde” (IRAS) vem sendo mais empregado, englobando todos os locais onde há prestação de cuidado e assistência à saúde. Portanto, o ambiente hospitalar não é o único local onde o paciente está passível de adquirir uma infecção (ARAÚJO, 2017; TARTARI, 2016; CALDART, 2020).

Esses eventos adversos são bastante recorrentes e estão diretamente relacionados ao aumento da mortalidade e incapacidade física temporária ou permanente dos pacientes acometidos (MACVANE, 2016). A organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece as IRAS como um grave problema de saúde pública, afetando pacientes em todo mundo. Nesse cenário global, os países em desenvolvimento apresentam uma carga de IRAS elevada, significativamente superior se comparado aos países desenvolvidos (PADOVEZE; FORTALEZA, 2014). Enquanto nos países desenvolvidos cerca de 5% a 10% dos pacientes hospitalizados são acometidos por no mínimo uma infecção, quando se refere aos países em desenvolvimento esse número cresce para 25% (CHAGAS, 2015).

Restringindo esse panorama ao Brasil, podemos observar um índice de infecção entre pacientes internados de 15,5%, 3 vezes maior que a média mundial, que corresponde a 5% (ROCHA et al., 2010). Entre essas infecções a mais comum e mais grave é a pneumonia, seguida de sepse, infecções de trato urinário e infecções de sítios cirúrgicos (ARAÚJO, 2017).

Conseguir controlar essas infecções vem se mostrando um desafio bastante complexo, sobretudo em UTIs. Inúmeros fatores contribuem para esse cenário, tal como o próprio quadro de saúde dos pacientes, que foram submetidos a procedimentos invasivos e/ou encontram-se imunocomprometidos; a transmissão cruzada associada a rotatividade dos leitos, já que os microrganismos presentes no corpo do paciente e nos arredores do leito podem persistir por longos períodos em superfícies e serem transferidos para o próximo paciente que o ocupa, além da administração prévia e indiscriminada de antibióticos de amplo espectro, que geralmente é mais elevado nos países em desenvolvimento, particularmente em unidades críticas

(SANTOS, 2016; HEINEK, 2012;).

No estudo de Porto e colaboradores (2020), foi relatado um consumo de antibióticos de 52,2% no Brasil, o qual variou de acordo com a região, 48,6% no Sul e o Nordeste detentor do maior percentual, correspondendo a 60,4%, sendo os antimicrobianos mais utilizados: ceftriaxona (12,8%), meropenem (12,3%) e vancomicina (10,3%). Esse cenário favorece a pressão seletiva sobre esses microrganismos, colaborando com a disseminação de bactérias multirresistentes, limitando as alternativas terapêuticas e consequentemente, aumentando o período de internação e risco, gerando grande impacto social e financeiro (PEDROSO et al., 2021; MOREIRA et al., 2013).

Nos últimos anos, vêm crescendo o número de IRAS causadas por bactérias Gram-negativas multirresistentes, sendo *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp, *P. aeruginosa*, *Enterobacter* spp., e *A. baumannii* os patógenos que mais se destacam, esse fato pode ser atribuído à capacidade de aquisição de diversos mecanismos de resistência por esses microrganismos (MACVANE, 2016).

2.2 Importância Clínica de *A. baumannii*

Entre os organismos ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* e *Enterobacter* spp.), grupo de patógenos com uma alta taxa de resistência antimicrobiana implicada em infecções nosocomiais humanas, *A. baumannii* vem ganhando bastante notoriedade, emergindo como um dos patógenos mais problemáticos nos últimos 10 anos, tornando-se a espécie de maior importância clínica do gênero *Acinetobacter* spp., que deriva do grego “Akinetos” (não móvel), uma das características do gênero. Essas bactérias, pertencentes à família *Moraxellaceae*, são cocobacilares Gram-negativos, estritamente aeróbios, não fermentadoras de glicose, não-fastidiosos, não produtoras de pigmentos, catalase-positivas e oxidase- negativas (ARAÚJO, 2017; SANTOS, 2016; CALDART, 2020; TUTTOBENE et al., 2021).

Apesar de encontrar-se amplamente distribuído na natureza, sendo isolado inicialmente do solo por Beijerinck em 1991, esse patógeno é predominantemente hospitalar, encontrados com maior frequência na UTI e enfermarias de hospitais gerais. O complexo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (ACB) vem sendo constantemente associado a infecções nosocomiais, predominantemente pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV), uma das principais causas de alta taxa de mortalidade em pacientes gravemente enfermos, correspondendo a 8% e 14% da PAV nos Estados Unidos e na Europa, respectivamente. Essas taxas tornam-se mais altas na Ásia, América Latina e alguns países do Oriente Médio, apresentando uma variação

de 19% a 50%. Esse patógeno também está associado à septicemia, meningite, infecções do trato urinário e feridas, com altas taxas de mortalidade. (BEIJERINCK, 1911; HEINECK, 2012; RANA, 2020; AYOUB, 2020)

Um estudo de prevalência de infecções em UTIs, com amostra populacional de 75 países dos 5 continentes, esse microrganismo foi apontado como o quinto patógeno mais comum (ROCA, 2012). Uma grande proporção de pacientes pode ser colonizada por essas bactérias, há uma estimativa de 45.000 casos de infecções por *Acinetobacter* sp. por ano nos Estados Unidos e globalmente observa-se uma média de 1 milhão de casos anualmente, com uma variação de 600.000 a 1.400.000 (WONG, 2017; KEMPF, 2016).

Em 2019, uma pesquisa conduzida durante três anos por Huang e colaboradores, evidenciou uma alta taxa de incidência de transmissão de *A. baumannii* MDR correspondendo a 315,4 casos/1.000 pacientes-dia de UTI, durante esse período a taxa de resistência ao imipenem aumentou de 63,2 para 90,9%, quanto a taxa de mortalidade, pode-se observar uma variação de 52 a 66%.

A capacidade de *A. baumannii* adquirir ou regular vários determinantes de resistência por diferentes mecanismos, sejam mutações, aquisição de elementos genéticos ou ilhas genéticas de resistência, é um importante marcador associado a essas altas taxas de mortalidade, no entanto, diversos fatores contribuem para que esses índices se elevem exponencialmente, incluindo maior gravidade da doença de base, imunocomprometimento, tempo de hospitalização prolongado, uso de procedimentos invasivos e falhas nas práticas de prevenção e controle, além da propensão desses microrganismos em resistir a ambientes hostis através de mecanismos como a produção de biofilme (ROSSI, 2021; HADDA, 2012), fazendo com que as infecções se espalham rapidamente, com maior densidade nas UTIs, tornando-o responsável por surtos hospitalares em todo mundo.

2.3 Carbapenêmicos

O potencial clínico dos microrganismos foi reconhecido pela primeira vez em 1877, por Pasteur e Joubert, à medida que esse potencial foi sendo explorado surgiu uma das mais importantes substâncias na batalha do homem contra microrganismo, o antimicrobiano. A definição clássica inicialmente proposta o caracterizava como compostos produzidos por microrganismos com o objetivo de destruir ou inibir outros microrganismos sem afetar o hospedeiro, atualmente essa definição foi ampliada a fim de incluir os produtos sintéticos e semissintéticos (TORTORA et al., 2017; PASTER; JOUBERT, 1877). Esses fármacos possuem propriedades bactericidas ou bacteriostáticas, e podem ser classificados de diversas

formas, como de acordo com o mecanismo de ação contra o microrganismo, sendo essa a mais comum, quanto a sua estrutura química, síntese, efeito no microrganismo e espectro de ação, a qual este último refere-se à diversidade de organismos sensíveis afetados pelo agente (CHAGAS, 2015).

Os antibióticos são parte integrante de vários subgrupos, como β -lactâmicos, quinolonas, tetraciclina, macrolídeos, sulfonamidas e outros. O subgrupo dos β -lactâmicos, assim denominados por apresentarem como estrutura em comum um anel β -lactâmico, composto por três átomos de carbono e um de hidrogênio, são fármacos de ação bactericida e englobam quatro famílias: penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos, sendo a penicilina, substância secretada pelo fungo *Penicillium notatum*, o primeiro β -lactâmico a ser descoberto, em 1928, por Alexander Fleming. Esses agentes representam quase dois terços das prescrições hospitalares em todo mundo. Os carbapenêmicos são β -lactâmicos semissintéticos, originalmente produzidos por *Streptomyces*, de amplo espectro e baixa toxicidade, considerados a classe mais confiável e de último recurso no tratamento de infecções graves, demonstrando alta eficácia no tratamento de infecções provocadas por bactérias gram-negativas e multirresistentes, incluindo *A. baumannii*. Atualmente os principais representantes dessa classe são: imipenem, meropenem, ertapenem e doripenem, apresentando maior espectro de ação, sendo utilizados no tratamento de infecções causadas por cepas produtoras de β -lactamases de Espectro Estendido (ESBL) (LIMA, 2018; HEINECK, 2012; TARTARI, 2016; FLEMING, 1929; BUSH; BRADFORD, 2016).

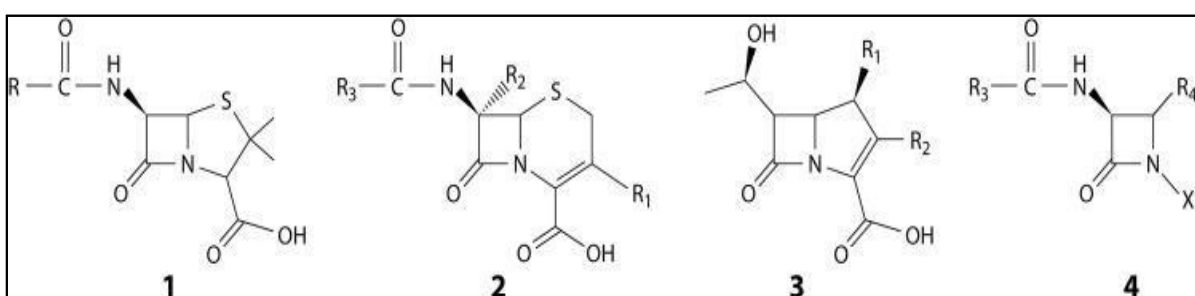
O mecanismo de ação dos carbapenêmicos, dentre todos os outros β -lactâmicos é a interrupção da síntese da parede celular bacteriana formada por peptidoglicanos. A camada peptidoglicana é o principal componente estrutural da parede celular da maioria das células bacterianas, essencial para seu crescimento e desenvolvimento. Essa camada é formada por uma cadeia de resíduos dissacarídeos, consistindo em moléculas de *N*-acetilglucosamina e ácido *N*-acetilmurâmico alternadamente. Essas cadeias são ligadas de forma cruzada por pontes peptídicas, formando uma malha rígida para a bactéria, conferindo estabilidade mecânica. Esse processo de construção da cadeia através de ligações cruzadas é catalisado por enzimas reguladoras específicas (ex: transpeptidase, transglicosilase, carboxipeptidase), as PBPs, membros da família serina-protease, que vão atuar de forma externa a membrana citoplasmática (MURRAY et al., 2014).

As PBPs desempenham um papel importante na formação e manutenção da parede celular e possuem capacidade de se fixar aos β -lactâmicos através de semelhanças estruturais, geométricas e estereoquímicas entre as ligações amida do β -lactâmico e o substrato enzimático.

Assim, esta ligação inibirá a ação da PBP na formação da cadeia peptidoglicana, esse processo vai catalisar a atividade das autolisinas, ocasionando a biodegradação da parede celular, e consequentemente, a morte da célula. As PBPs são classificadas de acordo com seu peso molecular, e são diferentes para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, assim como sua especificidade química para drogas carbapenêmicos específicas. Em geral, existem pelo menos quatro PBPs na maioria das espécies de bactérias, em Gram-negativas as essenciais são 1a, 1b, 2 e 3, de modo geral os carbapenêmicos ligam-se fortemente a PBP2 (MURRAY et al., 2014; TRABULSI; ALTERTHUM, 2015; BUSH; BRADFORD, 2016; LIMA et al., 2020).

O imipenem foi o primeiro carbapenêmico a ser disponibilizado para o tratamento em 1985, desde então vem sendo amplamente utilizado para infecções causadas por bactérias Gram-negativas, Gram-positivas, não fermentadoras e anaeróbicas. Apesar desse agente apresentar alta afinidade pelas PBPs e estabilidade frente as β -lactamases ele sofre inativação frente a enzima desidropeptidase I (DHP-1), o que leva a sua administração a ser associada a um inibidor de DHP-1, a cilastatina sódica. Com o intuito de se obter fármacos que não sofressem influência da DHP-1, foram desenvolvidos carbapenêmicos que possuísem um radical metil em R1, protegendo a molécula da ação da DHP-1, surgindo assim o meropenem, ertapenem, doripenem, biapenem e tebipenem. O meropenem, quando comparado ao imipenem, pode ser até 4 vezes mais potentes no tratamento de enterobactérias, mas essa eficácia é reduzida quando se trata de bactérias Gram-positivas. O biapenem e tiabipenem até o momento só foram aprovados para uso no Japão (PAPP-WALLACE et al., 2011; BUSH; BRADFORD, 2016).

Figura - 1: Estruturas genéricas de β -lactâmicos.



Penicilina (1), cefalosporina (2), carbapenem (3) e monobactam (4). Fonte: BUSH, 2020.

2.4 Mecanismos de Resistência aos Antimicrobianos β -lactâmicos

O crescente surgimento de resistência aos β -lactâmicos vem limitando as alternativas terapêuticas, evidenciando uma crise iminente na saúde pública. Os mecanismos pelos quais esses microrganismos desenvolvem resistência são diversos, e o primeiro mecanismo de

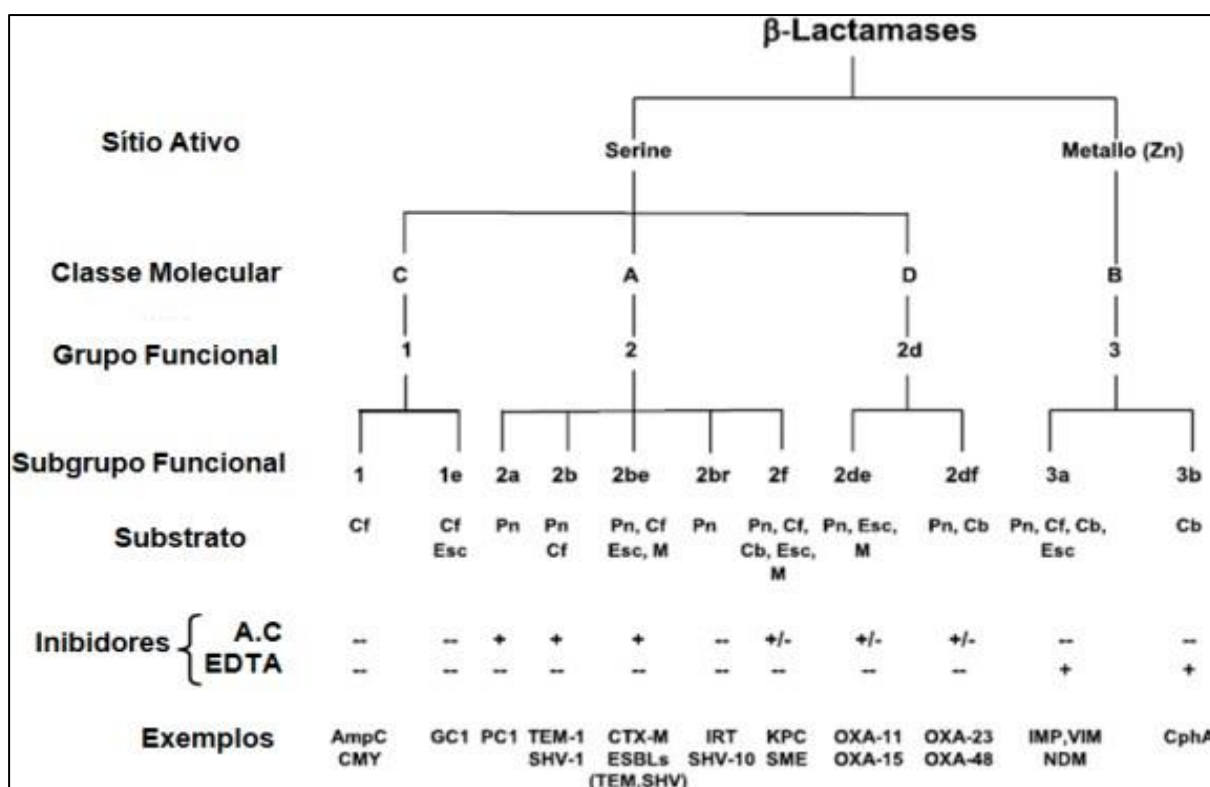
resistência foi observado em bactérias Gram-negativas, devido à existência de uma membrana externa sobreposta a camada peptidoglicana nesses microrganismos, para que o antimicrobiano possa exercer seu papel é necessário que ocorra a passagem através dos poros dessa membrana. Possíveis alterações nas porinas, proteínas que formam a parede dos poros, alteram o tamanho da abertura e/ou a carga destes canais, restringindo a quantidade de carbapenêmico que podem entrar na área periplasmática (ALFEI; SCHITO, 2022; TRABULSI; ALTERTHUM, 2015).

A resistência também pode ser adquirida por modificação da ligação do β -lactâmico a PBP através de uma superprodução dessa enzima ou aquisição de uma nova por meio de recombinação ou mutação pontual. Outro mecanismo comumente observado é o bombeamento de um fármaco para fora das células bacterianas antes que atinjam seu alvo através da superprodução de bombas de efluxos. Por fim, a resistência mediada por enzimas, que na maioria das vezes resulta da produção de β -lactamases, capazes de hidrolisar carbapenêmicos e outros antimicrobianos β -lactâmicos. Esse mecanismo de resistência representa a maior ameaça, uma vez que os genes que codificam essas enzimas são transportados em transposons, plasmídeos ou outros elementos genéticos móveis, que podem ser transferidos horizontalmente para outras espécies bacterianas. (KIM et al., 2023; KAPPOR; SAIGAL; ELONGAVAN, 2017; ABOU-ASSY et al., 2021)

As β -lactamases são enzimas versáteis, que apresentam uma característica em comum, a capacidade de hidrolisar compostos químicos contendo um anel β -lactâmico. No entanto, essas enzimas existem antes mesmo da pressão exercida pelos antimicrobianos, surgindo através de fontes ambientais, estudos filogenéticos modernos datam sua existência a cerca de 2 bilhões de anos (MILLER, 1979; BUSH, 2018).

Atualmente essas enzimas são o grupo mais estudado e conhecido, podendo ser classificadas de acordo com a sequência de aminoácidos, segundo Ambler em 4 classes (Figura 2), onde A, C e D são serina β -lactamases, agindo através de sítios ativos de serina, já a classe B são as metalo β -lactamases (MBL), essas enzimas necessitam de cátions divalentes, normalmente o zinco, como cofator para a reação de hidrólise do anel β -lactâmico (QUEENAN; BUSH, 2007; MENDES et al., 2006).

Figura-2: Classificação molecular e funcional das principais β -lactamases.



Fonte: BUSH, 2018.

A classe A representa um grupo de extrema importância clínica e epidemiológica devido o surgimento de enzimas com a capacidade de hidrolisar cefalosporina de espectro estendido, as β -lactamases de espectro estendido (ESBL). As ESBL como a CTX-M originaram-se de β -lactamases de espectro restrito, como TEM-1, TEM-2 e SHV-1, penicilinas encontradas em bactérias Gram-negativas, sendo parcialmente inibidas pelo ácido clavulânico (CURY, 2021).

As β -lactamases de classe C são descritas como cefalosporinas, consideradas as mais abundantes devido ao grande número de bactérias que a produzem, sendo representantes desse grupo as enzimas CMY, ACT, DHA, FOX, MIR e AmpC (PEREIRA, 2017).

As oxacilinas se agrupam na classe D e representam a família OXA, essas enzimas degradam a oxacilina e cloxacilina mais rapidamente que outros β -lactâmicos. O maior grupo de oxacilinas descrito até o momento é o grupo OXA-51. Essas carbapenemases são frequentemente encontradas em *A. baumannii*, sendo o grupo OXA-23 o primeiro a ser identificado nessa espécie, em 1985 no Reino Unido. Outras carbapenemases de classe D de importância clínica são OXA-24/40 e OXA-48, sendo esta ultima a carbapenemase de classe D mais eficiente na degradação do imipenem, quando comparada a outras carbapenemases de

classe D (LIMA, 2018; PEREIRA, 2017).

A classe B corresponde as metalo β -lactamases (MBL) e são enzimas que hidrolisam uma ampla gama de β -lactâmicos, inclusive os carbapenêmicos, com exceção apenas dos monobactâmicos. Por utilizarem o íon de zinco sua atividade é inibida por agentes quelantes, como ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). As MBL mais importantes descritas na literatura até o momento compreendem os tipos NDM, IMP e VIM (CURY, 2021).

2.5 Resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii*

São diversos os mecanismos que conferem resistência em *A. baumannii*, podendo ser de origem intrínseca, a qual todos os isolados apresentam essa característica, ou adquirida, geralmente observada em apenas alguns isolados. Esse patógeno é considerado MDR quando resiste a pelo menos três classes de agentes antimicrobianos, incluindo todas as penicilinas e cefalosporinas, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos. Por outro lado, é considerado extensivo resistente a drogas (XDR) quando o isolado MDR é resistente aos carbapenêmicos e Pandrug resistente (PDR) quando o isolado XDR também é resistente a polimixinas e tigeciclina (EL-BADWAY et al., 2022).

A produção de carbapenemase é sem dúvida um dos mecanismos mais importantes e frequentes, responsáveis por conferir resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii*. Essas enzimas estão relacionadas a 3 classes moleculares diferentes segundo Ambler. A classe A, por exemplo, KPC e IMI. Classe B ou as MBL, por exemplo, VIM, IMP e NDM e carbapenemase de classe D ou as chamadas carbapenemases do tipo OXA, em *A. baumannii*, são subdivididas em cinco grupos OXA-51, OXA-23, OXA-24/40, OXA-58 e OXA-143. Tratando-se de amostras resistentes aos carbapenêmicos observa-se a prevalência da enzima OXA-23, sendo esta a única que não pode ser inibida pelo ácido clavulânico. Um dos genes que codifica a produção de oxacilinas, o *bla*_{OXA-51}, é usado como marcador da espécie *A. baumannii*. (EL-BADWAY et al., 2022; QUEIROZ; MACIEL; SANTOS, 2022; SERAFIM, 2018).

No entanto, a resistência a carbapenêmicos não depende exclusivamente de mecanismo enzimáticos como a produção de carbapenemases, outros fatores também podem contribuir para essa resistência, podendo haver a combinação de diferentes mecanismos de resistência a drogas no mesmo microrganismo. Mecanismos não enzimáticos de resistência como a superexpressão de bombas de efluxo de drogas, modificação da permeabilidade da membrana ou alterações nas PBPs são fatores importantes ligados ao surgimento de *A. baumannii* MDR (GUPTA; ANGADI; JADHAV, 2022).

O sistema de efluxo é caracterizado pela passagem de substâncias do meio intracelular para o extracelular, por meio de canais presentes na membrana interna da bactéria, chamados de bombas de efluxo. Esse mecanismo é capaz de expelir compostos tóxicos, resultando na diminuição da concentração de antimicrobianos no interior da bactéria, porém, é um transporte ativo e exige gasto de energia. Existem seis famílias de complexo de efluxo: superfamília cassete de ligação ATP (ABC), superfamília dos facilitadores principais (MFS), família de baixa resistência a multidrogas (SMR), família de extensão de multidrogas e compostos tóxicos (MATE) e família resistência-nodulação-divisão (RND). Várias bombas de efluxo, incluindo CraA, AmvA, CmlA, MdfA e Tet, pertencentes a família MFS, foram identificadas em *A. baumannii*. Bombas de efluxo do tipo AdeABC, AdeDE, AdeIJK, AdeXYZ e AdeFGH, membros da família RND, estão associadas à resistência ao carbapenem, prevalente em *Acinetobacter* spp. (SERAFIM, 2018; GUPTA; ANGADI; JADHAV, 2022).

A resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii* também pode ser atribuída à baixa permeabilidade da membrana externa pela alteração na expressão dos canais de porina, pelos quais passam os agentes antimicrobianos. Este método, mais comumente encontrado em bactérias Gram-negativas, envolve modificações no gene de expressão da porina ou alterações no gene que codifica a porina que resultam em deficiências ou na perda completa da porina associada. A diminuição da densidade de porinas da membrana (OMP-22–23, OMP-43, OMP-44, OMP-47, OMP-33–36, OMP-37 e CarO) foi associada à pan-resistência à drogas em *A. baumannii* (SERAFIM, 2018; GUPTA; ANGADI; JADHAV, 2022; LIMA, 2018).

Por fim, alterações nas PBPs, esse mecanismo geralmente está associado a resistência de baixo nível em carbapenêmicos. A alteração da proteína alvo está associada à alteração do sítio específico de ligação dos antibióticos na bactéria, diminuindo assim a afinidade da droga pelo sítio e, conseqüentemente, a atividade da droga (CHAGAS, 2015).

2.6 Detecção de Carbapenemases em *A. baumannii*

Infecções causadas por bactérias produtoras de carbapenemases representam um grave fator de risco, elevando consideravelmente a taxa de mortalidade nesses casos. Diante disto, uma detecção rápida e precisa é de extrema importância para a adoção de medidas de controle apropriadas, traçando esquemas antimicrobianos específicos e eficazes, visto que os microrganismos produtores de carbapenemases têm como característica a capacidade de inativar os principais carbapenêmicos disponíveis para a prática clínica. Nas últimas décadas diversos métodos fenotípicos e moleculares para detecção de carbapenemases foram

desenvolvidos, estes métodos diferenciam-se em vários aspectos, desde o valor de custo, o equipamento necessário para execução até ao tempo de resultado, mas ainda não existe nenhum método considerado o mais adequado para detecção de todas essas enzimas. Os métodos fenotípicos têm como vantagens serem de maneira geral mais baratos e detectarem a atividade da carbapenemase, não os genes específicos, sendo possível avaliar o surgimento de carbapenemases novas ou incomuns (PELOSO et al., 2017; CAMPOS, 2021).

2.6.1 Métodos Fenotípicos

O teste de Hodge modificado (THM) é uma das abordagens mais difundidas na detecção de carbapenemases, esse método mensura a resistência pelo crescimento bacteriano na presença do carbapenêmico, observando se há crescimento aumentado da *E. coli* ATCC 25922 em torno do isolado testado na intersecção da estria com a zona de inibição do antibiótico. Por ser de fácil realização, pode ser aplicado na rotina de laboratórios de microbiologia, entretanto, como já demonstrado em alguns trabalhos, isolados ocasionais podem apresentar resultados falso-negativos, como para OXA-23 e baixa sensibilidade para MBLs, além de elevados percentuais de falso-negativos para isolados produtores de NDM-1, demonstrando que esse teste é de fato confiável apenas para enzimas KPC em Enterobacteriaceae, com sensibilidade e especificidade superior a 90%. Diante de suas limitações, recomenda-se que o THM seja utilizado para rastreio de bactérias produtoras de carbapenemases e que a distinção entre as bactérias produtoras de MBL das não produtoras de MBL seja utilizada testes fenotípicos com o auxílio de um agente quelante, como o EDTA (CALDART, 2020; MELO, 2014).

Os testes CarbaNP e BlueCarba são métodos baseados na hidrólise do carbapenêmicos pela enzima, resultando em uma alteração colorimétrica devido a mudança do pH. O teste CarbaNP é capaz de identificar a produção da enzima carbapenemase em um extrato bacteriano através da quebra do imipenem, o que leva a uma mudança de cor no meio de vermelho para amarelo devido a acidificação. O teste apresenta um tempo de resposta máximo de duas horas, no entanto, a preparação dos reagentes necessários para este teste é complicada e as soluções não podem ser armazenadas por períodos prolongados, limitando sua aplicação clínica. O CarbaNP apresenta uma alta sensibilidade (entre 73% e 100%) para detectar a maioria das carbapenemases produzidas por Enterobacterales e *P. aeruginosa*, mas sua eficácia é limitada para detectar carbapenemases do tipo OXA, que são mais comuns em *A. baumannii*, uma vez que o teste tem dificuldade em identificar OXA-23. Uma versão modificada do teste CarbaNP,

o teste CarbAcinetoNP, realizado em condições de lise modificadas e um inóculo bacteriano aumentado, demonstrou uma melhoria em sua especificidade e sensibilidade, detectando eficientemente produtores de carbapenemase do tipo OXA. Outra variação de método colorimétrico é o BlueCarba que diferencia do CarbaNP apenas pela presença do indicador de pH azul de bromotimol. Esse indicador foi selecionado pois inclui a faixa de pH ideal (6,0 a 7,6) para detecção da maioria das carbapenemases (pH = 6,8) (CAMPOS, 2021; DORTET et al., 2014).

O método de inativação do carbapenêmico (CIM) foi descrito pela primeira vez em 2015 (VAN DER ZWALUW et al., 2015), e trata-se de um método simples de executar e interpretar além de não necessitar de materiais dispendiosos e altamente sensível na detecção de carbapenemases. Em 2017, baseado no CIM o CLSI propôs o método de inativação do carbapenêmico modificado (mCIM), desenvolvido através de uma pequena modificação na etapa de inativação do carbapenêmico. Uma alça cheia de 10 µl do isolado teste passou a ser preparada em 2ml de caldo TSB, substituindo a água e houve um aumento no tempo de incubação do disco nessa suspensão, que passou de 2:00h para 4:00h. Notando-se uma significativa melhora na capacidade de detectar uma grande variedade de carbapenemases, no entanto, sua aplicação se restringe a Enterobacteriaceae e *P. aeruginosa*, não sendo recomendado para *Acinetobacter* (CLSI, 2017; JING et al 2018; CAMPOS, 2021; KHUNTAYAPORN et al., 2021).

Destaca-se também que o mCIM não diferencia Enterobacterales e *P. aeruginosa* produtores de carbapenemases do tipo MBL, como alternativa a isso foi desenvolvida uma variação do método mCIM, o método de inativação do carbapenêmico modificado por EDTA (eCIM), seguindo o mesmo procedimento de mCIM, a diferença está na adição de 20 µL de EDTA 0,5M no tubo contendo 2ml de caldo TSB, o EDTA vai atuar como um agente quelante, inibindo a atividade da enzima MBL uma vez que ela utiliza o zinco como cofator. A interpretação de eCIM deve ser realizada em conjunto com mCIM, logo o resultado só pode ser considerado válido se ambos forem positivos (SFEIR et al., 2019; CAMPOS, 2021).

Com o intuito de detectar carbapenemases em bacilos Gram-negativos, em 2018 foi proposto por Jing e colaboradores o método simplificado de inativação do carbapenêmicos (sCIM), o protocolo é baseado em mCIM com algumas adaptações experimentais, diferente dos demais métodos, em sCIM não há a necessidade do disco de antibiótico ficar em contato com a suspensão bacteriana em caldo TSB, pois o disco de 10 µg de imipenem é esfregado diretamente no isolado a ser testado previamente crescido em ágar Sangue, e a suspensão de *E. coli* ATCC25922 é ajustada para 0,5 McFarland e diluída na proporção 1:10 em solução

salina para então ser esfregada em uma placa MHA. A placa MHA é incubada a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$, e o diâmetro da zona de inibição será medido entre 16 e 18 horas. Apesar do princípio dos métodos serem semelhantes, baseados na capacidade da carbapenemase hidrolisar o carbapenêmico as estratégias empregadas nos métodos para que isso aconteça são diferentes (JING et al., 2018).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Realizar a detecção fenotípica de carbapenemases em isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii*.

3.2 Objetivos específicos

- Coletar isolados clínicos de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos;
- Detectar a produção fenotípica de carbapenemases através de três testes em *A.baumannii* resistentes aos carbapenêmicos;
- Realizar uma comparação entre os métodos aplicados.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Área e Local do Estudo

O estudo foi desenvolvido a partir de isolados bacterianos coletados de pacientes internados no Hospital Regional Tarcísio Maia (HRTM), localizado na cidade de Mossoró, Rio Grande do Norte. Fundado a mais de 36 anos para atender a urgência e emergência. Atualmente contando com cerca de 500 servidores, este hospital é responsável por fazer a cobertura de cerca de um milhão de pessoas, na Mesorregião Oeste do Rio Grande do Norte (PORTALCOVID-19, 2021). Os isolados foram identificados e cedidos pelo laboratório de microbiologia do HRTM e as análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia Clínica (LABMIC) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), localizado no Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS).

4.2 População do Estudo

A população do estudo foi composta a partir de isolados clínicos multirresistentes de *A. baumannii*, coletados do laboratório de microbiologia do HRTM, situado no município de Mossoró-RN. Atendendo ao critério de ser resistente a no mínimo um carbapenêmico, de acordo com o teste de susceptibilidade por disco de difusão realizado previamente no laboratório hospitalar.

4.3 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo do tipo exploratório, observacional, quantitativo e transversal.

4.4 Coleta de dados

Durante o período de 2019 a 2023 foram coletados dados referentes aos isolados clínicos, sendo estes a data de coleta, tipo de amostra, ala proveniente, gênero/espécie identificados e o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos. Essas informações são oriundas dos livros de registro laboratoriais e/ou prontuários e foram armazenadas de forma que garantisse a confidencialidade, privacidade e segurança dos dados fornecidos.

4.5 Coleta das amostras

Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), sob o parecer de número 4.708.190. Além disso, ressalta-se que durante a coleta foi obrigatório o uso de Equipamentos de Proteção Individual (EPIs) como jaleco, máscara e luvas para biossegurança da pesquisa. Ademais, para assegurar e garantir a confidencialidade, privacidade

e segurança das informações, ao final da pesquisa os dados serão armazenados em armário fechado, sob responsabilidade do coordenador, por no mínimo cinco anos. A coleta das amostras foi realizada entre o período de 2019 a 2023, iniciando um mês após a aprovação do comitê de ética. Os isolados foram coletados por conveniência, assim como os dados de prontuário e transportados para serem processadas no LABMIC. Durante esse período foram coletados 114 isolados, bem como dados referentes a eles, supracitados em 4.4. Para garantia da biossegurança, todas as amostras foram armazenadas, transportadas, processadas e descartadas de acordo as definições de biorrepositório dispostas pela PORTARIA Nº 2.201, DE 14 DE SETEMBRO DE 2011 do Ministério da Saúde.

Dos espécimes coletados, 30 isolados clínicos identificados como *A. baumannii* e os dados contidos nos livros de registro laboratorial referentes a eles foram selecionados para compor a população desse estudo. Esses isolados foram obtidos a partir de diferentes amostras, das seguintes alas hospitalares: Clínica Médica (CM), Unidade de Pacientes Infectados (UPI), Unidade de Terapia Intensiva (UTI). Os microrganismos já haviam sido identificados previamente quanto ao gênero/espécie e atendiam ao critério de ser resistentes a pelo menos um carbapenêmico, de acordo com o teste de susceptibilidade por disco de difusão realizado no laboratório local. As amostras recolhidas foram transportadas ao prédio Biomédicas I seguindo os protocolos de biossegurança e identificados em uma planilha de acordo com o número de identificação, espécie, data da coleta, local de internamento e perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos, para que posteriormente fossem submetidas a realização do procedimento padrão de processamento e conservação.

4.6 Procedimento padrão de processamento e conservação dos isolados bacterianos

Chegando ao laboratório os isolados passaram por um procedimento padrão de processamento, que consiste na semeadura destes em ágar seletivo e diferencial a fim de verificar o grau de pureza da amostra para seguir com o armazenamento e posterior uso. Dessa forma, os isolados foram semeados em uma placa de Petri com dimensões correspondentes a 90x15mm preenchidas com ágar MacConkey (meio seletivo e diferencial para Gram-negativos), em seguida incubadas invertidas a 37°C por 24 horas, a fim de verificar o grau de pureza da cultura, confirmado este aspecto, posteriormente uma colônia de cada isolado foi semeada em ágar nutriente, meio de cultura de uso geral que fornece condições adequadas para crescimento microbiano, e incubadas por 24 horas na estufa bacteriológica a 37°C. Após esse período, alças cheias de colônias bacterianas foram depositadas em tubo *ependorf* contendo caldo Brain-Heart-Infusion (BHI) acrescido de glicerol a 20% em quadruplicatas, sendo 02

armazenadas no congelador (-20 °C) e 02 em freezer (-80°C). Todos os passos supracitados foram realizados em cabine de segurança biológica nível 2.

4.7 Testes fenotípicos

Para os testes fenotípicos, as amostras foram semeadas com auxílio de uma alça de platina em placas de petri com dimensões de 95x15mm preenchidas com ágar Sangue (meio de cultura rico e sem influências de componentes antibacterianos), oferecendo condições propícias para o crescimento da bactéria sem submetê-la a qualquer estresse, todos os procedimentos supracitados foram realizados em cabine de fluxo laminar nível 2. As placas foram encubadas invertidas a 37°C em estufa bacteriológica durante 24 horas, após esse período, os isolados foram submetidos aos testes de Modified Carbapenem Inactivation Method (mCIM), EDTA-Carbapenem Inactivation Method (eCIM) e Simplified Carbapenem Inactivation Method (sCIM).

4.7.1 Teste modified carbapenem inactivation method (mCIM)

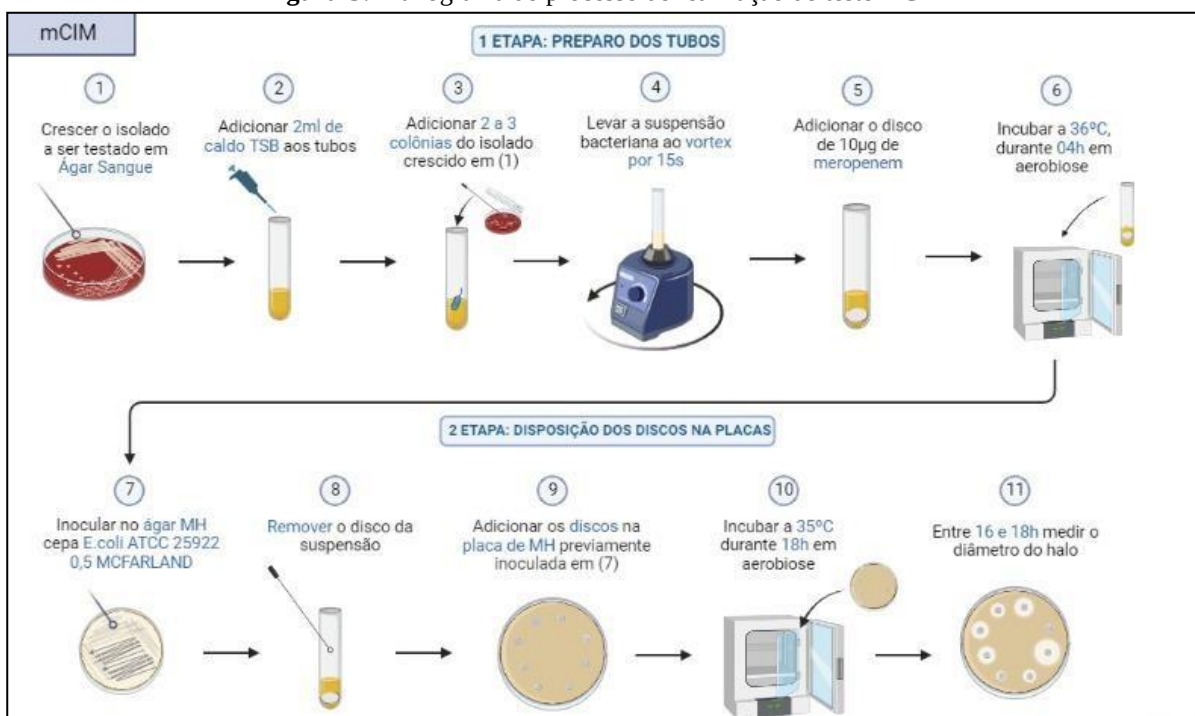
Para o mCIM, uma alça cheia com duas a três colônias de *A. baumannii*, previamente crescido em ágar sangue, foi adicionada em tubos de ensaio contendo 2 ml de Tryptic Soy Broth (caldo TSB) (meio de cultura não seletivo amplamente utilizado para pre- enriquecimento e manutenção de microrganismo). Em seguida a suspensão bacteriana contida no tubo de ensaio foi homogeneizada vigorosamente em vórtex por 10-15 segundos, ao fim dessa etapa, foi adicionado um disco de 10 µg de Meropenem nessa suspensão, que foi incubada a 35°C na estufa bacteriológica em aerobiose durante 04 horas.

A cepa padrão de *E. coli* ATCC25922, com turbidez equivalente a 0,5 Macfarland, com auxílio de um swab foi semeada em uma placa de petri com dimensões de 95x15mm contendo 24ml de ágar Mueller Hinton (MHA) pouco antes de finalizar o período de incubação do disco.

Após as 04 horas, o disco de 10 µg de meropenem foi removido da suspensão com auxílio de uma alça de plástico, certificando-se que o excesso de líquido foi removido por meio da fricção do disco nas paredes do tubo de ensaio, que após ser removido da suspensão foi colocado imediatamente sobre a placa contendo o MHA previamente inoculado com a *E. coli* ATCC25922, sendo esta incubada invertida a 35°C em aerobiose por 18 horas (Fig 1). Passado esse tempo, foi realizada a leitura do diâmetro do halo do Meropenem, verificando o tamanho do mesmo em milímetros, onde halo inferior a 15mm indica que a bactéria degradou o antibiótico e é produtora de carbapenemase, quando o halo está entre 16 e 18mm o resultado é inconclusivo, para halos iguais ou maiores que 19mm indica que a bactéria não é produtora de

carbapenemase (CLSI, 2017; PIERCE et al., 2017).

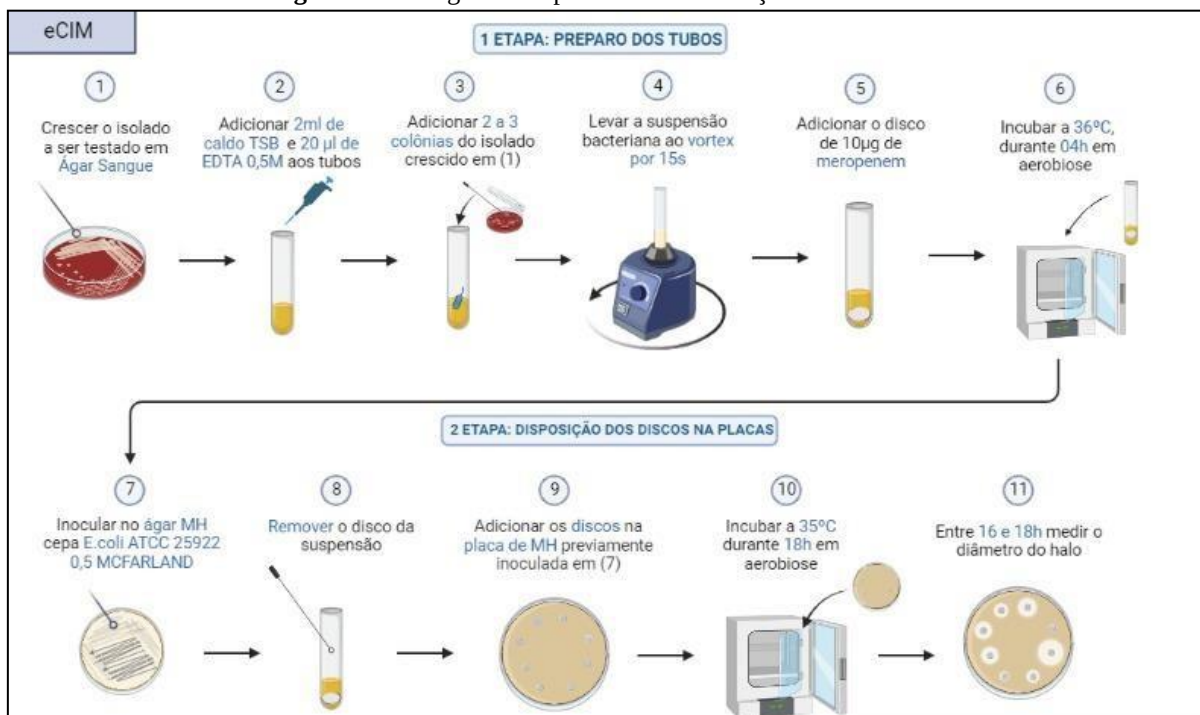
Figura-3: Fluxograma do processo de realização do teste mCIM



4.7.2 Teste carbapenem inactivation method (eCIM)

A fim de identificar a produção de metalo- β -lactamase, foi desenvolvida uma variação do teste mCIM, o método de inativação do carbapenêmico modificado por EDTA (eCIM) onde ambos devem ser realizados e interpretados em conjunto, visto que o resultado de um depende da confirmação do outro, respectivamente.

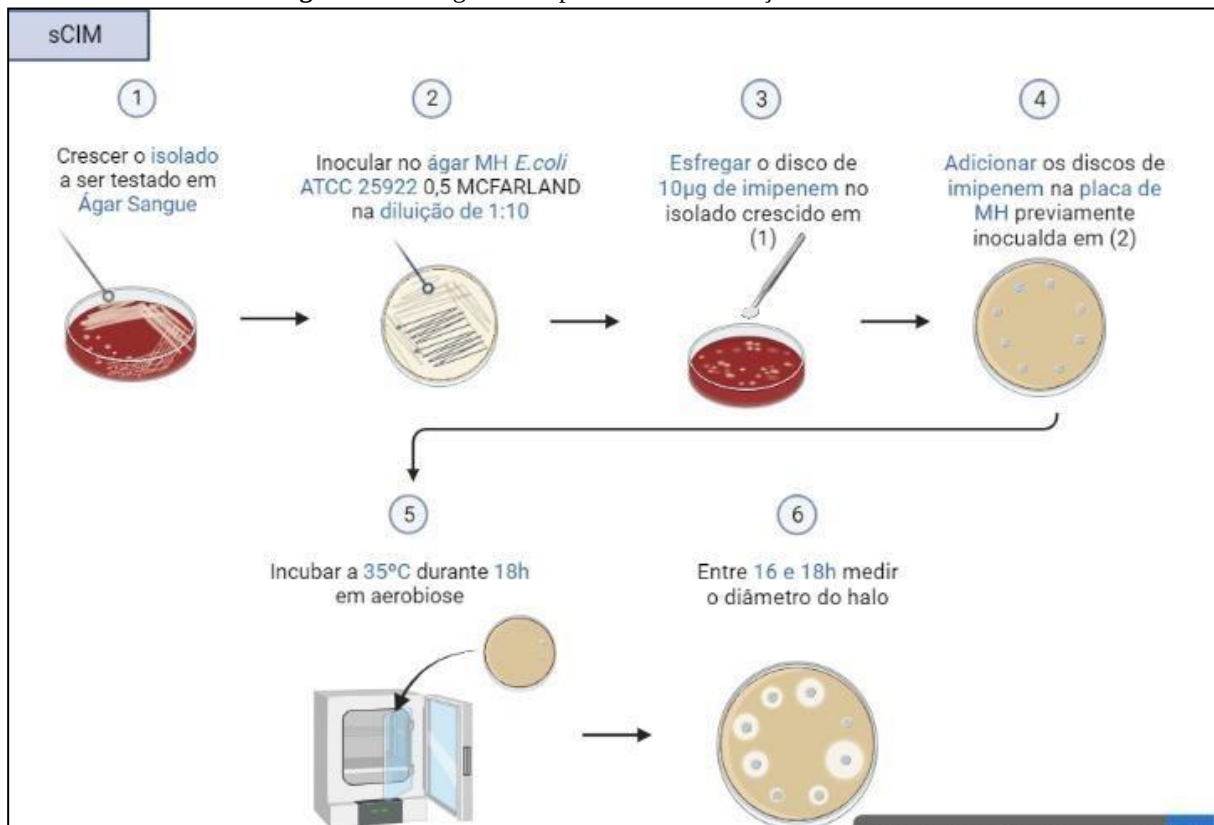
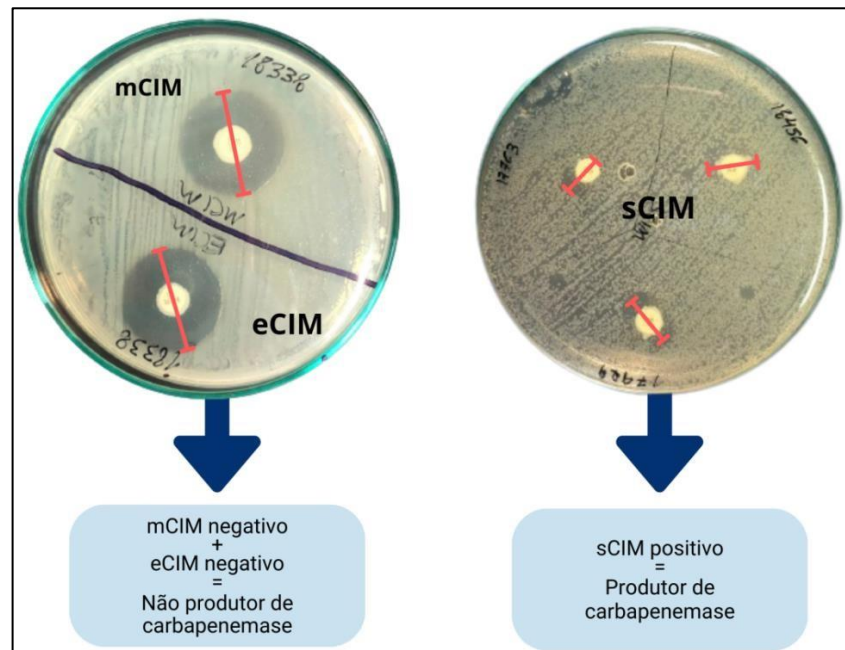
Nesse caso, a diferença está na etapa 2 do item 4.7.1, que contou com a adição de 20 μ L de EDTA 0,5 M no tubo contendo 2ml de caldo TSB, o EDTA atua como um agente quelante inibindo a atividade da enzima MBL uma vez que essa enzima utiliza o zinco como cofator. Dado isto, os demais passos supracitados no item anterior foram repetidos (Fig 2). Para identificar se a bactéria é produtora de metalo- β -lactamase o diâmetro do halo apresentado em eCIM deve ser pelo menos 5mm maior que o obtido em mCIM quando este for positivo para carbapenemases (SFEIR et al., 2019).

Figura-4: Fluxograma do processo de realização do teste eCIM

4.7.3 Teste simplified carbapenem inactivation method (sCIM)

Em contraste com os demais métodos sCIM foi realizado aplicando o disco diretamente sobre o isolado a ser testado, não havendo a necessidade de uma etapa de preparo da suspensão bacteriana em tubos. Dessa forma, A cepa padrão de *E. coli* ATCC25922, com turbidez equivalente a 0,5 Macfarland, foi diluída na proporção 1:10, e com auxílio de um *swab* essa solução foi semeada em placas de petri com dimensões de 95x15mm contendo 24 ml de ágar Mueller-Hinton. Em seguida, utilizando uma pinça o disco de 10 µg de Imipenem foi esfregado em cerca de 01 a 03 colônias do isolado, previamente crescido em Ágar Sangue, de forma que ficasse todo recoberto, então foi imediatamente aplicado na placa com ágar MH previamente inoculada com *E. coli* ATCC25922, certificando-se que o lado do disco recoberto com o isolado estava em contato com o meio de cultura. As placas foram incubadas invertidas na estufa bacteriológica a 35°C em aerobiose por 18h (Fig 5).

Passado o período de incubação, foi realizado a leitura em milímetros do diâmetro do halo formado ao redor do disco de Imipenem, quando o diâmetro do mesmo é menor ou igual a 22mm ou se houver a formação de colônias satélites ao redor do disco o resultado é considerado positivo, para halos entre 23 e 25mm o resultado é inconclusivo, quando se trata de halos superiores a 26mm o resultado é assegurado como negativo (JING et al., 2018).

Figura-5: Fluxograma do processo de realização do teste sCIM**Figura-6:** Resultados e interpretação dos testes mCIM, eCIM e sCIM.

5. RESULTADOS

Foram incluídos no estudo 30 bacilos Gram-negativos, coletados de diferentes amostras entre o período de 2019 a 2022, previamente identificados quando a espécie, tratando-se de *Acinetobacter* sp., e o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos (Tabela 1). Após o processo de descongelamento, todas as amostras apresentaram-se viáveis, sendo semeadas em ágar sangue.

Tabela-1: Dados referentes aos isolados testados resultados

Nº de ID	Data da Coleta	Espécie	Tipo de Amostra
7426	01/09/2020	<i>Acinetobacter</i> sp	Hemocultura
13507	20/11/2019	<i>Acinetobacter</i> sp	Secreção de ferida
13554	06/12/2019	<i>Acinetobacter</i> sp	Secreção Traqueal
13577	12/12/2019	<i>Acinetobacter</i> sp	Ponta cateter
14561	25/08/2020	<i>Acinetobacter</i> sp	Secreção traqueal
14604	02/09/2020	<i>Acinetobacter</i> sp	Secreção traqueal
14647	14/09/2020	<i>Acinetobacter</i> sp	Secreção traqueal
14709	01/10/2020	<i>Acinetobacter</i> sp	Secreção do dreno
14736	05/10/2020	<i>Acinetobacter</i> sp	Secreção traqueal
14740	05/10/2020	<i>Acinetobacter</i> sp	Secreção traqueal
15035	26/11/2020	<i>Acinetobacter</i> sp	Secreção traqueal
15310	12/01/2021	<i>Acinetobacter</i> sp	Secreção traqueal
15451	05/02/2021	<i>Acinetobacter</i> sp	Secreção traqueal
17704	07/10/2021	<i>Acinetobacter</i> sp	Secreção traqueal
17708	07/10/2021	<i>Acinetobacter</i> sp	Secreção traqueal
17763	14/10/2021	<i>Acinetobacter</i> sp	Secreção traqueal
17922	03/11/2021	<i>Acinetobacter</i> sp	Lesão do calcanhar
17929	03/11/2021	<i>Acinetobacter</i> sp	Secreção traqueal
17975	09/11/2021	<i>Acinetobacter</i> sp	Ponta do cateter
17978	09/11/2021	<i>Acinetobacter</i> sp	Secreção traqueal
18338	04/01/2022	<i>Acinetobacter</i> sp	Fragmento de tecido
18384	11/01/2022	<i>Acinetobacter</i> sp	Fragmento de lesão
18421	16/01/2022	<i>Acinetobacter</i> sp	Aspirado traqueal
18456	22/01/2022	<i>Acinetobacter</i> sp	Ponta do cateter
18582	08/02/2022	<i>Acinetobacter</i> sp	Secreção traqueal
18583	08/02/2022	<i>Acinetobacter</i> sp	Secreção traqueal
19816	06/07/2022	<i>Acinetobacter</i> sp	Secreção traqueal
20453	12/09/2022	<i>Acinetobacter</i> sp	Secreção traqueal
20751	23/10/2022	<i>Acinetobacter</i> sp	Secreção traqueal
20980	22/11/2022	<i>Acinetobacter</i> sp	Secreção traqueal

Dos 30 isolados clínicos de *A. baumannii* incluídos no estudo, pode-se observar que 26 (86,67%) (Gráfico 1) apresentaram resultados positivos quando submetidos ao método simplificado de inativação do carbapenem (sCIM), indicando que as cepas bacterianas produzem carbapenemases devido a capacidade de hidrolisar o imipenem, formando um halo de inibição ao redor do disco com diâmetro entre 0 e 20 mm. Em alguns casos também se pode observar a formação de pequenas colônias ao redor do disco de imipenem, caracterizando o fenômeno das chamadas colônias satélites. Os demais isolados apresentaram resultados negativos, com zona de inibição superior a 22mm, variando entre 30 e 32 mm (Tabela 2).

Tabela-2: Resultados de sCIM de cada isolado testado.

Nº de ID	sCIM	Carbapenemases
7426	Sem halo	POSITIVO
13507	Sem halo	POSITIVO
13554	15mm	POSITIVO
13577	Sem halo	POSITIVO
14561	17mm	POSITIVO
14604	Sem halo	POSITIVO
14647	Sem halo	POSITIVO
14709	17mm	POSITIVO
14736	12mm	POSITIVO
14740	18mm	POSITIVO
15035	19mm	POSITIVO
15310	14mm	POSITIVO
15451	11mm	POSITIVO
17704	13mm	POSITIVO
17708	18mm	POSITIVO
17763	6mm	POSITIVO
17922	18mm	POSITIVO
17929	15mm	POSITIVO
17975	17mm	POSITIVO
17978	20mm	POSITIVO
18338	21mm	POSITIVO
18384	20mm	POSITIVO
18421	12mm	POSITIVO
18456	6mm	POSITIVO
18582	20mm	POSITIVO
18583	20mm	POSITIVO
19816	30mm	NEGATIVO
20453	32mm	NEGATIVO
20751	33mm	NEGATIVO
20980	32mm	NEGATIVO

Quanto a mCIM, apenas 03 (10%) (Gráfico 1) dos 30 microrganismos avaliados foram capazes de hidrolisar o disco de meropenem, apresentando a formação de uma zona de inibição nula ao redor do disco. Ao serem submetidos ao método eCIM com intuito de diferenciar as enzimas entre serina ou metalo β -lactamase 02 (6,67%) (Gráfico 1) isolados apresentaram resultados positivos, formando um halo maior que o obtido em mCIM, variando entre 08 e 10 mm, mostrando haver concordância entre os dois testes, dessa forma, indicando tratar-se de uma metalo β -lactamase. Para os demais 27 isolados os resultados foram negativos, pois a zona de inibição ultrapassou 15mm, apresentando halos com variação de 20a 30mm (Tabela 3).

Tabela-3: Resultados de mCIM e eCIM de cada isolado testado.

Nº de ID	mCIM	eCIM	Carbapenemase
7426	24mm	25mm	NEGATIVO
13507	25mm	15mm	NEGATIVO
13554	24mm	26mm	NEGATIVO
13577	27mm	23mm	NEGATIVO
14561	24mm	24mm	NEGATIVO
14604	21mm	20mm	NEGATIVO
14647	23mm	16mm	NEGATIVO
14709	28mm	29mm	NEGATIVO
14736	23mm	27mm	NEGATIVO
14740	24mm	20mm	NEGATIVO
15035	27mm	30mm	NEGATIVO
15310	21mm	25mm	NEGATIVO
15451	24mm	19mm	NEGATIVO
17704	27mm	29mm	NEGATIVO
17708	28mm	28mm	NEGATIVO
17763	29mm	28mm	NEGATIVO
17922	26mm	26mm	NEGATIVO
17929	28mm	29mm	NEGATIVO
17975	27mm	28mm	NEGATIVO
17978	20mm	28mm	NEGATIVO
18338	26mm	26mm	NEGATIVO
18384	29mm	28mm	NEGATIVO
18421	28mm	29mm	NEGATIVO
18456	28mm	29mm	NEGATIVO
18582	27mm	29mm	NEGATIVO
18583	30mm	28mm	NEGATIVO
19816	Sem halo	10mm	metalo β -lactamase
20453	Sem halo	Sem halo	serina β -lactamase
20751	16mm	Sem halo	INCONCLUSIVO
20980	Sem halo	8mm	metalo β -lactamase

Os testes não apresentaram concordância entre si (Tabela 4), todos os resultados determinados como positivo em sCIM foram negativos para mCIM e eCIM. Os isolados que testaram positivo em mCIM, sendo dois deles caracterizados como produtores de MBL pelo método de eCIM, apresentaram resultados negativos em sCIM.

Tabela-4: Comparação dos resultados dos três testes fenotípicos

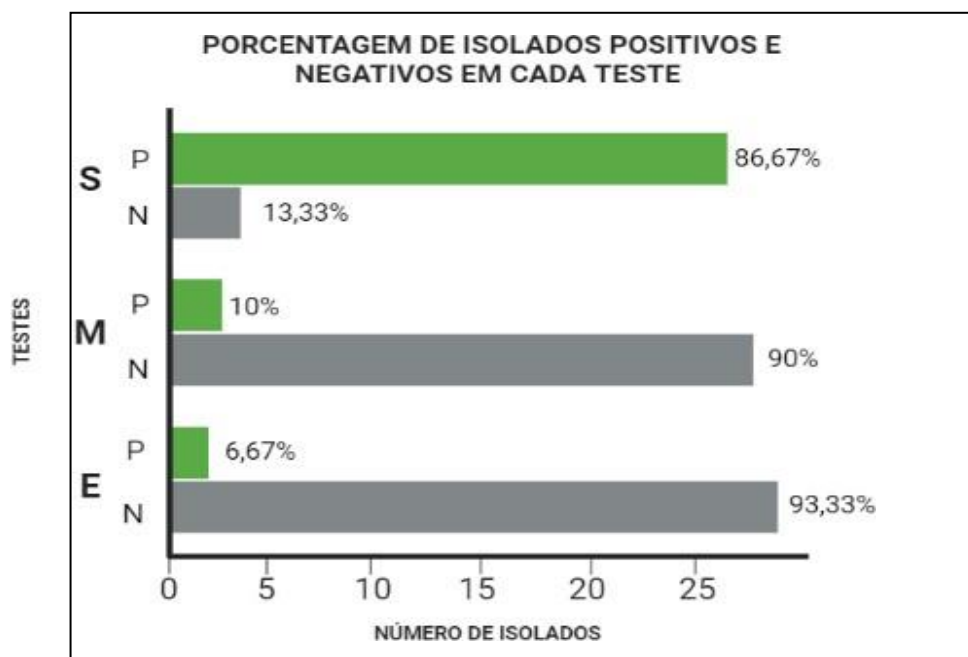
Nº DE ID	mCIM	eCIM	sCIM
7426	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
13507	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
13554	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
13577	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
14561	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
14604	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
14647	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
14709	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
14736	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
14740	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
15035	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
15310	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
15451	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
17704	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
17708	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
17763	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
17922	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
17929	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
17975	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
17978	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
18338	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
18384	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
18421	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
18456	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
18582	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
18583	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
19816	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
20453	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
20751	INCONCLUSIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
20980	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO

Em relação aos custos para execução de cada teste, sCIM demonstrou ser mais vantajoso devido a redução de etapas, e consequentemente, insumos necessários para realizá-lo, apresentando uma redução de custos de 31,2% em comparação aos demais testes.

Tabela-5 : Comparação entre as despesas para realização de cada teste fenotípico calculadas através de uma média do valor dos insumos em 03 empresas diferentes.

DESPESAS PARA EXECUÇÃO DOS TESTES mCIM, eCIM e sCIM					
Materiais			Valor Médio		
mCIM	eCIM	sCIM	mCIM	eCIM	sCIM
TUBOS DE ENSAIO	TUBOS DE ENSAIO	TUBOS DE ENSAIO	10und 22,80	10 und 22,80	10und 22,80
PLACAS DE PETRI 90x15mm	PLACAS DE PETRI 90x15mm	PLACAS DE PETRI 90X15MM	10und 25,00	10und 25,00	10und 25,00
ALÇAS DESCARTÁVEIS	ALÇAS DESCARTÁVEIS	ALÇAS DESCARTÁVEIS	100und 25,73	100und 25,73	100und 25,73
DISCOS DE MEROPENEM	DISCOS DE MEROPENEM	DISCOS DE IMIPENEM	50und 18,95	50und 18,95	50 und 15,80
MUELLER HINTON AGAR	MUELLER HINTON AGAR	MUELLER HINTON AGAR	500g = 380,25	500g = 380,25	500g = 380,25
ÁGAR SANGUE	ÁGAR SANGUE	AGAR SANGUE	500g = 402,00	500g = 402,00	500g = 402,00
CALDO TSB	CALDO TSB		500g = 299,33	500g = 299,33	
	EDTA 0,5 MOLAR			100ml = 90,00	
TOTAL			1.174,06	1.264,06	871,58

Gráfico-1: Porcentagem de resultados positivos (P) e negativos (N) dos isolados de acordo com cada teste fenotípico, sendo S para sCIM; M para mCIM e E para eCIM.



6. DISCUSSÃO

O crescente aumento da resistência bacteriana em *A. baumannii* vem tornando esse patógeno uma das ameaças a saúde mais urgentes desse século, estando frequentemente associado a infecções nosocomiais, com uma mortalidade geral relatada de até 40% (GRANATA et al., 2022). A produção de carbapenemase do tipo OXA é o principal mecanismo pelo qual esse patógeno desenvolve resistência aos antibióticos carbapenêmicos, a identificação rápida e precisa de microrganismos produtores dessas enzimas é crucial na prevenção do desenvolvimento de surtos hospitalares. Vários testes fenotípicos com essa finalidade foram propostos até o momento, no entanto, a triagem fenotípica de carbapenemase em *A. baumannii* continua sendo um desafio (ZHANG et al., 2021).

Apesar do princípio dos métodos serem semelhantes, uma vez que ambos partem do pressuposto que o microrganismo suspeito de possuir resistência será capaz de hidrolisar o carbapenêmicos, as estratégias empregadas para que isso aconteça são distintas entre si (JING et al., 2018). O método mCIM mostrou ser mais complexo devido a necessidade de várias etapas e diferentes meio de cultura, o que conseqüentemente o torna mais dispendioso e laborioso em comparação a sCIM, exigindo uma maior quantidade de insumos e tempo para executá-lo.

Essas diferenças entre os métodos podem ser atribuídas a mudanças realizadas na etapa de inativação do carbapenêmico. Em sCIM as bactérias produtoras de carbapenemase são esfregadas nos discos de imipenem, dessa forma a enzima vai se espalhar e hidrolisar o antibiótico no papel, outra diferença está na utilização do disco de imipenem, em geral as diferentes carbapenemases apresentam diferentes taxas de hidrólise para diferentes carbapenêmicos, mas ao utilizar imipenem observou-se uma constância da zona de inibição para diferentes tipos de carbapenemases, facilitando a interpretação dos resultados experimentais, enquanto para meropenem houve uma variação considerável dessa zona. O fato de sCIM ter menos etapas e apresentar mais eficiência para detectar carbapenemases em bactérias Gram-negativas o torna mais conveniente para esse fim (JING et al., 2018).

As modificações propostas para sCIM também resultaram em uma otimização do tempo necessário para execução do teste, enquanto em mCIM o disco de antibiótico é submetido a incubação em uma suspensão bacteriana durante 04 horas, resultando em um tempo total de aproximadamente 20 horas para execução do teste, em sCIM essa etapa não é necessária, reduzindo em 04 horas o tempo necessário para se obter o resultado.

Em relação a eficiência dos testes na detecção de carbapenemases tratando-se de isolados de *A. baumannii*, mCIM apresentou baixa sensibilidade, testando positivo apenas

para 3 isolados, sendo dois desses caracterizados como produtores de metalo- β -lactamase após serem submetidos a eCIM. Um estudo conduzido por Khuntayaporn e colaboradores (2021) relatou baixa sensibilidade desse teste na identificação de todas as carbapenemases de classe D, sobretudo OXA-23, enzima prevalente em *A. baumannii*, sendo o primeiro grupo a ser identificado na espécie estando frequentemente associada a resistência aos carbapenêmicos.

Kubichiro e colaboradores (2021), também notaram uma baixa sensibilidade de mCIM em *Acinetobacter* sp., sendo significativamente inferior tratando-se de serina-carbapenemases de classe A e D, principalmente tratando-se de OXA-23 e OXA-51, codificada intrinsecamente em *A. baumannii*. No entanto, não houve problemas quanto a detecção de metalo- β -lactamase. Portanto, esse teste não apresenta boa sensibilidade na detecção de carbapenemases em *A. baumannii*, esse fato pode ser atribuído a baixa atividade hidrolítica de carbapenemases do tipo OXA, principal mecanismo atribuído a característica de resistência aos carbapenêmicos nessa espécie.

Tratando-se de sCIM, a eficiência na detecção dessas enzimas foi significativamente maior, além de ser um método mais fácil de se executar, rápido e barato. No entanto, os resultados podem ser influenciados pela quantidade de bactérias dispostas sobre o disco de imipenem, logo, uma pequena quantidade pode afetar o diâmetro da zona de inibição, levando a resultados negativos, mas quando a mesma amostra é submetida ao teste novamente com uma quantidade de bactérias mais abundantes sobre o disco de imipenem o resultado pode ser inconclusivo ou positivo (ZHANG et al., 2021).

De modo geral, o método sCIM mostrou-se muito promissor, sendo capaz de detectar a presença de carbapenemases em 86,67% dos isolados testados nesse estudo, os demais resultados negativos obtidos no teste podem ser atribuídos ao fato de possivelmente tratar-se de enzimas de classe B, levantando a hipótese que o teste não seja tão eficiente para detecção de metalo- β -lactamase, ou pode haver a produção de múltiplas enzimas β -lactamase, condição que contribui para os resultados falso-positivos. Também deve-se levar em consideração que a resistência aos carbapenêmicos pode ser mediada por vários mecanismos diferentes nesses organismos não fermentadores como perda de porinas ou aumento da atividade da bomba de efluxo devido a alterações em genes localizados cromossomicamente, associado a enzimas com capacidade hidrolítica inferior, também podem causar resistência (SIMNER, 2019).

Khuntayaporn e colaboradores (2021) relataram uma boa sensibilidade de sCIM para uma grande variedade de carbapenemases de classe D, exceto para OXA-24 sozinha ou em combinação com OXA-58, como alternativa a isso o estudo propõe uma associação do método sCIM com o CarbacinetoNP. Devido ser muito dispendioso o método CarbacinetoNP acaba

sendo inviável a depender das condições e recursos, ao submeter a esse teste apenas os resultados negativos ou inconclusivos obtidos em sCIM torna essa associação mais vantajosa financeiramente bem como aumenta o seu desempenho e confiabilidade dos resultados, apresentando especificidade e sensibilidade de 100%.

Existem diversas razões pelas quais uma variedade de testes fenotípicos não apresenta eficácia ao lidar com *A. baumannii*. Primeiramente, devido à baixa permeabilidade intrínseca da membrana externa, a efetividade de testes como o Carba NP, que dependem da destruição celular e liberação de β -lactamases, fica comprometida. Além disso, as carbapenemases mais comuns produzidas por *A. baumannii* são do tipo OXA, as quais não possuem eficiência na degradação de carbapenêmicos, ao contrário de outras carbapenemases, como as pertencentes a classe A e metalo- β -lactamases da classe B, que conferem alta resistência a β -lactâmicos. A resistência significativa aos carbapenêmicos observada em cepas de *A. baumannii* produtoras de carbapenemases do tipo OXA é resultado da associação com outros mecanismos de resistência, como mutações em porinas ou efluxo. Todos esses fatores dificultam a detecção precisa de todas as carbapenemases por meio de qualquer tipo de teste fenotípico com *A. baumannii* (SUN et al., 2017; POTRON; POIREL; NORDMANN, 2015).

Apesar dos carbapenêmicos continuarem sendo a classe de antibiótico mais comumente usados contra infecções multirresistentes a constante evolução dessas enzimas aumentaram os esforços na busca de novos agentes terapêuticos com aplicações clínicas estendidas. As novas combinações de um β -lactâmico com um inibidor de β -lactamase vem sendo uma alternativa no combate a resistência de bactérias produtoras de carbapenemase. As novas combinações de carbapenêmico+inibidores de β -lactamase aprovadas pela Food and Drug Administration (FDA) são meropenem-vaborbactam (MEV) e imipenem-cilastatina/relebactam (ICR). Ambos os inibidores demonstraram grande atividade contra β -lactamases de classe A e C. Estudos demonstram que MEV possui uma alta potência inibitória contra serina carbapenemases, especialmente KPC, enquanto ICR é um agente promissor para o tratamento de *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemase. Além disso, o ICR pode prevenir a resistência de *P. aeruginosa* inibindo AmpC. No entanto, essas combinações são afetadas por mecanismos de resistência não enzimática, como alterações de OMP ou PBP e superexpressão de sistemas de efluxo (WEIYU et al., 2022; CASTANHEIRA et al., 2021).

Algumas combinações de inibidores de β -lactâmicos+inibidores de β -lactamase vêm perdendo a eficácia contra patógenos Gram-negativos, sobretudo os produtores de ESBLs, Carbapenemases ou múltiplas β -lactamases em um mesmo organismo. Embora vários agentes empregados no tratamento de ESBL que podem poupar os carbapenêmicos já estejam em um

estado avançado de desenvolvimento clínico, nenhum inibidor equivalente está disponível para as MBLs, e o tratamento continua sendo uma necessidade não atendida, pois além do cefiderocol, a maioria dos agentes com atividade de MBL ainda está em desenvolvimento clínico. Associações como imipenem-relebactam e meropenem-vaborbactam demonstraram elevar significativamente a atividade do imipenem e meropenem contra enterobactérias, no entanto, não apresentam efeitos sobre *A. baumannii*, entre os poucos agentes com atividade sobre *A. baumannii* resistente a carbapenêmicos, ensaios clínicos de fase III com durlobactam/sulbactam apresentam resultados promissores (ZHANEL et al.,2018; BUSH; BRADFORD, 2019; PATERSON; BURCU; STEWART, 2020).

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A identificação precoce das enzimas carbapenemases em *A. baumannii* é crucial para prevenir o desenvolvimento de surtos hospitalares e instruir o tratamento clínico adequado, devendo ser considerada como prioridade a necessidade de métodos laboratoriais rápidos e precisos para identificação de tais isolados, mesmo em locais com pouco recurso.

O desempenho dos testes fenotípicos para detecção de carbapenemases em bacilos Gram-negativos varia de acordo com a espécie bacteriana. A pesquisa identificou uma baixa sensibilidade de mCIM e eCIM, demonstrando que esse método não é o mais adequado, levando em consideração a espécie *A. baumannii*.

Em contrapartida, os resultados obtidos em sCIM demonstraram que o teste obteve um desempenho muito superior, uma vez que os resultados positivos foram superiores a 80%, além de uma otimização no tempo de execução e a necessidade de poucos insumos, mostrando ser um teste de alta reprodutibilidade e sensibilidade.

Os testes fenotípicos para detecção de bacilos Gram-negativos ainda não estão bem definidos, são diversos e não há um método específico padronizado para realizar essa detecção em *Acinetobacter* sp.. Portanto, não existe um método mais recomendado nesse caso, havendo a necessidade de se avaliar a necessidade, recursos e endemicidade locais para adequação da melhor metodologia.

REFERÊNCIAS

- ABOU-ASSY, Rawan Samy et al. Mecanismos de Resistência a Carbapenemas, Disseminação de Genes de Carbapenemase e Métodos de Detecção Laboratorial: Uma Revisão. **Revista Brasileira de Desenvolvimento**, v. 7, n. 2, p. 10515-10526, 2021. Disponível em: <<https://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/27219/21923>>. Acesso em: 27 abr. 2023.
- ALFEI, Silvana; SCHITO, Anna Maria. β -Lactam Antibiotics and β -Lactamase Enzymes Inhibitors, Part 2: Our Limited Resources. **Pharmaceuticals (Basel)**, v. 15, n. 4, p. 476, 2022. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9031764/> >. DOI: 10.3390/ph15040476.
- ALTERTHUM, Flavio; TRABULSI, Luiz Rachid. **Microbiologia**. 6ª edição. São Paulo: Atheneu, 2015.
- AMBLER RP. **The structure of β -lactamases**. Phil Trans R Soc Lond. 1980;289:153–78.
- ANTUNES, Luísa CS et al. Acinetobacter baumannii: evolução de um patógeno global. **Análise doença patogênica**, v. 71, n. 3, p. 292-301, ago. 2014. DOI: 10.1111/2049-632X.12125. PMID: 24376225. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24376225/>.
- ARAUJO LIMA, Ana Vitória. **Caracterização genética e bioquímica de isolados de Acinetobacter baumannii e Pseudomonas aeruginosa multidroga-resistente (MDR) e extensivamente-resistente (XDR) obtidos de dois hospitais públicos do Recife-Pernambuco, Brasil**. 2017. 94 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia) -Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2017.
- AYOUB, C. M.; HALAT, D. H. **The Current Burden of Carbapenemases : Review of Significant Properties and Dissemination among Antibiotics**. 2020;9(186):1– 34. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biomedicina) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.
- BRADY, Mark F.; JAMAL, Zohaib; PERVIN, Najwa. Acinetobacter. 1. ed. New York: **Nova Science Publishers**, 2019. ISBN 978-1-53616-729-5.
- BUSH, Karen. Past and Present Perspectives on β -Lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 62, n. 10, p. e01076-18, out. 2018. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6153792/#B36> >. DOI: 10.1128/AAC.01076-18. PMID: 30061284. PMC6153792.
- BUSH, Karen; BRADFORD, Patricia A. Interplay between β -lactamases and new β -lactamase inhibitors. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 5, p. 295-306, may. 2019. DOI: 10.1038/s41579-019-0159-8.
- BUSH, Karen; BRADFORD, Patricia A. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 6, n. 8, a025247, 2016. DOI: 10.1101/cshperspect.a025247.

CALDART, Raquel Voges. **Infecções hospitalares e caracterização genética de *Acinetobacter baumannii* resistentes aos carbapenêmicos de Boa Vista, Roraima**. 2020. 120 f. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária) - Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2020.

CAMPOS, Hemilly Pereira. **Avaliação de métodos fenotípicos para detecção de carbapenemases diretamente de frascos de hemocultura**. Trabalho de Conclusão do Curso (Graduação em Farmácia: Bacharelado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2021.

CARVALHO, K. R. **Estudo da diversidade genética, caracterização fenotípica e molecular de mecanismos de resistência a antimicrobianos e virulência em *Acinetobacter baumannii* isolados em hospitais do Rio de Janeiro**. 2013. 163 f. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro, 2013.

CASTANHEIRA, Mariana et al. Activity of ceftazidime/avibactam, meropenem/vaborbactam and imipenem/relebactam against carbapenemase-negative carbapenem-resistant Enterobacterales isolates from US hospitals. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 58, n. 5, p. 106439, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2021.106439>.

CDC - Centro de Controle e Prevenção de Doenças, Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos EUA. **Relatório de ameaças AR 2019**. [Citado em 19 de maio de 2023]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest-threats.html>.

CHAGAS, Thiago Pavoni Gomes. **Caracterização de *Acinetobacter* spp. multirresistentes produtores de carbapenemases, dos tipos OXA e NDM, isolados de diferentes regiões do Brasil**. 2015. 118 f. Tese (Doutorado em Medicina Tropical) - Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, 2015.

CLSI. *Padrões de desempenho para testes de sensibilidade antimicrobiana*. 26ª ed. Suplemento CLSI M100-S26. Wayne, PA, EUA: **Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais**; 2016.

CLSI. *Padrões de desempenho para testes de sensibilidade antimicrobiana*. 27ª ed. Suplemento CLSI M100-S27. Wayne, PA, EUA: **Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais**; 2017.

CLSI. *Padrões de desempenho para testes de sensibilidade antimicrobiana*. 28ª ed. Suplemento CLSI M100-S28. Wayne, PA, EUA: **Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais**; 2018.

CURY, Ana Paula. **Avaliação de método molecular para detecção de colonização por carbapenemases comparado com a cultura de vigilância diretamente do swab retal**. São Paulo, 2021. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2021.

DORTET, Laurent et al. CarbAcineto NP Test for Rapid Detection of Carbapenemase-Producing *Acinetobacter* spp. **J Clin Microbiol**, v. 52, n. 7, p. 2359-2364, jul. 2014. DOI: 10.1128/JCM.00594-14

EL-BADAWY, Mohamed F.; ABDELWAHAB, Sayed F.; ALGHAMDI, Saleh A.;

SHOHAYEB, Mohamed M. Characterization of phenotypic and genotypic traits of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates recovered from a tertiary care hospital in Taif, Saudi Arabia. **infection and drug resistance**, v.12, p. 3113-3124, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/IDR.S206691>. Acesso em: 04 de maio de 2023.

FLEMING, A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. **British journal of experimental pathology**. v. 10, n. 3, p. 226– 236, 1929.

GIAMMANCO, A. et al. Global Assessment of the Activity of Tigecycline against Multidrug-Resistant Gram-Negative Pathogens between 2004 and 2014 as Part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial. **mSphere**, [s.l.], v. 2, n. 1, p. e00310-16, Jan. 2017. PMC. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5244261/>.

GRANATA, Guido et al. Durlabactam in the Treatment of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Infections: A Systematic Review. **J Clin Med**, v. 11, n. 12, p. 3258, junho 2022. DOI: 10.3390/jcm11123258.

GUPTA, Neetu; ANGADI, Kalpana; JADHAV, Savita. Molecular Characterization of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* with Special Reference to Carbapenemases: A Systematic Review. **Infection and Drug Resistance**, v. 15, p. 7631-7650, 2022.

HADDA, H. et al. Efeito da formação de biofilme na sobrevivência de *Acinetobacter baumannii* em superfícies secas. **Journal of Hospital Infection**, v. 80, p. 56-60, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2011.10.005>. Acesso em: 24 abr. 2023.

HAMILTON-MILLER, JMT. **Uma introdução histórica às beta-lactamases**. In: HAMILTON-MILLER, JMT; SMITH, JT (Ed.). *Beta-lactamases*. Londres, Reino Unido: Academic Press, 1979. p. 1–16.

HEINECK, Bianca Lúcia. **Caracterização e epidemiologia molecular de isolados de *Acinetobacter baumannii* resistente e sensível aos carbapenêmicos em três hospitais de Porto Alegre**. 2012. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas: Bacharelado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

HUANG Y et al. Pneumonia associada à ventilação mecânica por *Acinetobacter baumannii*: eficácia clínica da terapia antimicrobiana combinada e resultados de testes de sensibilidade a medicamentos in vitro. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, p. 92, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00092>. Acesso em: 24 abr. 2023.

IBRAHIM, Susan et al. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* as an emerging concern in hospitals. **Molecular Biology Reports**, v. 48, n. 10, p. 6987–6998, ago. 2021. DOI: 10.1007/s11033-021-06690-6. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8403534/>.

JING, Xiaopeng et al. The Simplified Carbapenem Inactivation Method (sCIM) for Simple and Accurate Detection of Carbapenemase-Producing Gram-Negative Bacilli. **Front Microbiol**, v. 9, p. 2391, 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02391.

KAPOOR, Garima; SAIGAL, Saurabh; ELONGAVAN, Ashok. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. **J Anaesthesiol Clin Pharmacol**, v. 33, n. 3, p. 300–305, 2017. DOI: 10.4103/joacp.JOACP_349_15.

KEMPF, M.; ROLAIN, J. M.; Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 22, n. 9, p. 833-840, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.07.032>. Acesso em: 24 abr. 2023.

KHUNTAYAPORN, Piyatip et al. Comparative study of phenotypic-based detection assays for carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* with a proposed algorithm in resource-limited settings. **PLoS ONE**, v. 16, n. 11, p. e0259686, 2021. DOI: 10.1371/journal.pone.0259686.

KIM, Dogyeoung et al. Structural Insights for β -Lactam Antibiotics. **Biomol Ther**, v. 31, n. 2, p. 141–147, 2023. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9970833/>>. DOI: 10.4062/biomolther.2023.008. PMID: 36788654. PMC9970833.

KUCHIBIRO, Tomokazu et al. Comparison of the performance of three carbapenem inactivation methods for the detection of carbapenemase-producing gram-negative bacilli. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 27, n. 11, p. 1634-1638, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jiac.2021.07.021>>

KYRIAKIDIS, Ioannis et al. *Acinetobacter baumannii* Antibiotic Resistance Mechanisms. **Pathogens**, v. 10, n. 3, p. 373, mar. 2021. DOI: 10.3390/pathogens10030373. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8003822/>.

LEE, Chang-Ro et al. Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, p. 55, 2017. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00055. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5346588/>.

LIMA, Lidia Moreira et al. β -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 208, p.112829, 2020. DOI: 10.1016/j.ejmech.2020.112829.

LIMA, Mariana Magaldi de Souza. **Detecção Laboratorial de Amostras de Bacilos Gram Negativos Produtores de Carbapenemases, Isoladas de Pacientes Colonizados, Internados no Hospital Universitário Antônio Pedro**. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Biomedicina: Bacharelado) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2018. MACVANE, S. H. Antimicrobial Resistance in the Intensive Care Unit: A Focus on Gram- Negative Bacterial Infections. **J Intensive Care Med**. v. 31, n. 2, p. 89-95, 2016.

MENDES, R. E.; CASTANHEIRA, M.; PIGNATARI, A. C. C.; GALES, A. C. Metallo β lactamases. **J Bras Patol Med Lab**. v. 42, n. 2, p. 103-113, 2006.

MOREIRA, M.R. et al. Antimicrobial use, incidence, etiology and resistance patterns in bacteria causing ventilator-associated pneumonia in a clinical-surgical intensive care unit. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 1, p. 39-44, 2013.

<https://doi.org/10.1590/0037-868216722013>.

MOUBARECK, C. A.; HALAT, D. H. Insights into *Acinetobacter baumannii*: A Review of Microbiological, Virulence, and Resistance Traits in a Threatening Nosocomial Pathogen. *Antibiotics*, v. 9, n. 3, p. 119, 2020. DOI: 10.3390/antibiotics9030119. RAMIREZ, Maria Soledad; BONOMO, Robert A.; TOLMASKY, Marcelo E. Carbapenemases: Transforming *Acinetobacter baumannii* into a Yet More Dangerous Menace. **Biomolecules**, [s.l.], v. 10, n. 5, p. 720, 2020. ISSN 2218-273X. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7277208/>.

MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A. *Microbiologia Médica*. 7ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier HS - Education, 2014.

PADOVEZE, M. C.FORTALEZA, C. M. Healthcare-associated infections: challenges to public health in Brazil. **Rev Saude Publica**, v.48, n.6, p.995-1001. 2014.

PAPP-WALLACE, K. M.; ENDIMIANI, A.; TARACILA, M. A.; BONOMO, R. A. Carbapenems: Past, present, and future. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 11, p. 4943-4960, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.00296-11>.

PASTEUR, L.; JOUBERT, J. Charbon et septicémie. **Gauthier-Villars**, Paris, 1877. PATERSON, David L. et al. New treatment options for multiresistant gram negatives. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 33, n. 2, p. 214-223, apr. 2020. DOI: [10.1097/QCO.0000000000000627](https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000627)

PELOSO, Pedro F.; LEITE, Cassiana da Costa Ferreira; DAVID, Rosemary Nogueira; FILHO, Helio Magarinos Torres. Importância Clínica e Epidemiológica na Detecção Rápida de Bactérias Produtoras de Carbapenemase. **Journal of Infection Control**, v. 5, 2017. Disponível em: <https://www.researchgate.net>. Acesso em: 05 de maio de 2023

PEREIRA, Mayne de Oliveira. **Caracterização fenotípica e genotípica de *Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas aeruginosa* produtores de carbapenemases**. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, 2017.

PIERCE, V. M. et al. The modified carbapenem inactivation Method (mCIM) for phenotypic detection of carbapenemase production among Enterobacteriaceae. **J. Clin. Microbiol.**, v. 55, p. 2321–2333, 2017. DOI: 10.1128/JCM.00193-17.

PIERCE, V.M. et al. Modified carbapenem inactivation method for phenotypic detection of carbapenemase production among Enterobacteriaceae. **Journal of Clinical Microbiology**, v.55, P. 2321, doi: 10.1128/JCM.00193-17.

PORTO, A.P.M. et al. Global point prevalence survey of antimicrobial consumption in Brazilian hospitals. **Journal of Hospital Infection**, v. 104, n. 2, p. 165-171, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2019.10.016>.

POTRON, Anaïs et al. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. **Int J Antimicrob Agents**, v. 45, n. 6, p. 568-585, 2015. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2015.03.001.

QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. **Clin Microbiol Rev.** v. 20, n. 3, p. 440-458, 2007.

QUEIROZ, Yamine Maia de et al. Mecanismo de resistência da bactéria *Acinetobacter baumannii* e suas implicações no controle das infecções hospitalares. Belém, PA, Brasil: **Escola Superior da Amazônia (ESAMAZ)**. v. 54, n. 1, p. 37-43, 2022. DOI: 10.21877/2448-3877.202202098.

RANA, H. et al. Role of Environmental Reservoirs in Disseminating Antimicrobial-Resistant *Acinetobacter baumannii* and Its Interplay with Human Health: An Overview. **Antibiotics**, v. 9, n. 3, p. 119, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antibiotics9030119>.

ROCA, I.; ESPINAL, P.; VILA-FARRÉS, X.; VILA, J. The *Acinetobacter baumannii* oxymoron: commensal hospital dweller turned pan-drug-resistant menace. **Frontiers in microbiology**, v. 3, p. 148, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00148>. Acesso em: 24 abr. 2023.

ROCHA, L. F.; LEMES, N. A.; BRASILEIRO, M. E. A atuação da Comissão de Controle de Infecção em Serviços de Saúde na Unidade de Terapia Intensiva: O que fazer? **Revista Eletrônica de Enfermagem do Centro de Estudos de Enfermagem e Nutrição**, v. 1, n. 1, p. 1-16, 2010.

ROESCH, E. W. **Importância da pressão de colonização bacteriana e da pressão seletiva do uso de antimicrobianos na aquisição de isolados de *Acinetobacter baumannii* multirresistente em unidades de terapia intensiva.** Tese de doutorado em Epidemiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

SANTOS, Ruthe Aline da Silva. **Caracterização molecular de *Acinetobacter baumannii* em um hospital público de Dourados/MS.** 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) – Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, 2016.

SERAFIM, GS. ***Acinetobacter baumannii*: mudança de resistência a carbapenêmicos e perspectivas atuais.** Trabalho de Conclusão do Programa de Aprimoramento Profissional. Instituto Adolfo Lutz – Centro de Laboratório Regional – VI, Ribeirão Preto, 2018.

SFEIR, M. M. et al. EDTA•Modified Carbapenem Inactivation Method: a Phenotypic Method for Detecting Metallo• β •Lactamase•Producing Enterobacteriaceae. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 57, n. 5, 2019.

SIMNER, Patricia J. et al. Multicenter Evaluation of the Modified Carbapenem Inactivation Method and the Carba NP for Detection of Carbapenemase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. **J Clin Microbiol**, v. 56, n. 1, p. e01369-17, 2018. DOI: 10.1128/JCM.01369-17.

SUN, Kunling et al. Evaluation of Six Phenotypic Methods for the Detection of Carbapenemases in Gram-Negative Bacteria With Characterized Resistance Mechanisms. **Ann Lab Med**, v. 37, n. 4, p. 305-312, 2017. DOI: 10.3343/alm.2017.37.4.305.

TARTARI, Daniela Cristina. **Rastreio, identificação e caracterização genética de *Acinetobacter* spp. isolados de ambiente hospitalar**. 2016. 104 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2016. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/168119>.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. Microbiologia. 12. ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2017.

TUTTOBENE, M.R. et al. A luz modula importantes determinantes patogênicos e virulência em Patógenos ESCAPE *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. **J. Bacteriol.**, v. 203, n. 5, e00566-20, 2021. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1128/JB.00566-20>. Acesso em: 24 abr. 2023.

VAN DER ZWALUW, K. et al. O método de inativação de carbapenem (CIM), uma alternativa simples e de baixo custo para o teste Carba NP para avaliar a atividade fenotípica de carbapenemase em bacilos gram-negativos. **PLoS One**, v. 10, p. e0123690, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0123690.

WEINER, Lindsey M. et al. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011–2014. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 37, n. 11, p. 1288–1301, nov. 2016. DOI: 10.1017/ice.2016.174. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6857725/>.

WONG, D. et al. Clinical and pathophysiological overview of *Acinetobacter* infections: a century of challenges. **Clinical microbiology reviews**, v. 30, n. 1, p. 409–447, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/CMR.00058-16>.

YU, Wei et al. Eficácia e segurança de novas combinações de inibidores de carbapenem- β -lactamase: resultados dos ensaios de fase II e III. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 12, p. 925662, 2022. Disponível em: < <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.925662> >. Acesso em: 02 maio 2023.

ZHANEL, George G. et al. Imipenem-Relebactam and Meropenem-Vaborbactam: Two Novel Carbapenem- β -Lactamase Inhibitor Combinations. **Drugs**, v. 78, n. 1, p. 65–98, 2018. DOI: 10.1007/s40265-017-0851-9.

ZHANG, Anru et al. Performance Evaluation of Diagnostic Assays for Detection and Classification of Carbapenemase-Producing Organisms. **Antibiotics**, v. 10, n. 12, p. 1457, 2021. DOI: 10.3390/antibiotics10121457.