

MICROBIOLOGIA CLÍNICA PARA O CONTROLE DE INFECÇÃO RELACIONADA À ASSISTÊNCIA À SAÚDE

Módulo 10 – Detecção dos Principais Mecanismos
de Resistência Bacteriana aos Antimicrobianos pelo
Laboratório de Microbiologia Clínica



MICROBIOLOGIA CLÍNICA PARA O CONTROLE DE INFECÇÃO RELACIONADA À ASSISTÊNCIA À SAÚDE

Módulo 10 – Detecção dos Principais
Mecanismos de Resistência Bacteriana
aos Antimicrobianos pelo Laboratório de
Microbiologia Clínica

Copyright © 2020 Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Todos os direitos reservados. É permitida a reprodução parcial ou total dessa obra, desde que citada a fonte e que não seja para venda ou qualquer fim comercial.

A responsabilidade pelos direitos autorais de textos e imagens dessa obra é da área técnica.

A Anvisa, igualmente, não se responsabiliza pelas ideias contidas nessa publicação.

1ª edição – 2020

Elaboração, distribuição e informações:

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA

SIA Trecho 5, Área Especial 57

CEP: 71205-050 Brasília – DF

Tel.: (61) 3462-6000

Home page: www.gov.br/anvisa/pt-br

Diretoria

Antônio Barra Torres – Diretor-Presidente

Alessandra Bastos Soares

Cristiane Rose Jourdan Gomes

Meiruze Sousa Freitas

Alex Machado Campos

Juvenal de Souza Brasil Neto Daniela Marreco Cerqueira

Daniela Marreco Cerqueira

Patricia Oliveira Pereira Tagliari

Gerência Geral de Tecnologia em Serviços de Saúde – GGTES

Guilherme Antônio Marques Buss

Gerente de Vigilância e Monitoramento em Serviços de Saúde –

GVIMS/GGTES

Magda Machado de Miranda Costa

Coordenação Técnica:

Afonso Luis Barth – Hospital de Clínicas de Porto Alegre e

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Juliana Caierão – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Luciana Silva da Cruz de Oliveira – Anvisa

Redação:

Adriana Cardenas – Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; Afonso Luís Barth – Hospital de Clínicas de Porto Alegre e Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Ana Paula D'Alincourt Carvalho Asséf – Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar (LAPIH), Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz; Darlan Augusto da Costa Rocha – Grupo Fleury Setor de Pesquisa e Desenvolvimento; Doroti de Oliveira Garcia – Centro de Laboratório Regional de Marília – Instituto Adolfo Lutz; Fernanda Esposito – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade de São Paulo; Ivson Cassiano de Oliveira Santos - Instituto Oswaldo Cruz; Jorge Luiz Mello Sampaio – Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; Juliana Caierão – Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Melise Chaves Silveira - Instituto Oswaldo Cruz; Nilton Lincopan – Departamento

de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; Orlando Carlos da Conceição Neto – Seção de Microbiologia do Hospital Central da Aeronáutica do Rio de Janeiro; Raquel Regina Bonelli – Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro

Revisores externos:

Afonso Luís Barth – Hospital de Clínicas de Porto Alegre e Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Ana Cristina Gales – Universidade Federal de São Paulo/Escola Paulista de Medicina; Elizabeth de Andrade Marques - Faculdade de Ciências Médicas - Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia - Universidade de Estado do Rio de Janeiro (UERJ); Jorge Luís Mello Sampaio – Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; Juliana Caierão – Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Marcelo Pillonetto - Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN/PR) e Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR)

Revisão técnica – Anvisa:

Ana Clara Ribeiro Bello dos Santos; André Anderson Carvalho; Andressa Honorato Miranda de Amorim; Cleide Felícia de Mesquita Ribeiro; Heiko Thereza Santana; Humberto Luiz Couto Amaral de Moura; Lilian de Souza Barros; Luciana Silva da Cruz de Oliveira; Magda Machado de Miranda Costa; Mara Rúbia Santos Gonçalves; Maria Dolores Santos da Purificação Nogueira; Suzie Marie Gomes

Vídeos:

Ana Paula D'Alincourt Carvalho Asséf – Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar (LAPIH)/Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz; Andreza Francisco Martins – Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Cláudio Marcos Rocha de Souza – Instituto Oswaldo Cruz; Marcelo Pillonetto – Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN/PR) e Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR); Otávio von Ameln Lovison – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Projeto Gráfico e Diagramação:

All Type Assessoria Editorial Eireli

Capa:

Camila Contarato Burns – Anvisa

Ficha Catalográfica

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 10 – Detecção dos Principais Mecanismos de Resistência Bacteriana aos Antimicrobianos pelo Laboratório de Microbiologia Clínica/Agência Nacional de Vigilância Sanitária.– Brasília: Anvisa, 2020.

160p.: il.10 volumes

ISBN: 978-65-89701-01-9

1. Infecção Relacionada à Assistência à Saúde – Controle. 2. Infecção em Serviços de Saúde. 3. Microbiologia Clínica. 4. Vigilância Sanitária em Serviços de Saúde. 5. Resistência microbiana. I. Título.

SUMÁRIO

Apresentação	7
Capítulo 1: Introdução	9
1.1 Referências bibliográficas.....	15
Capítulo 2: Bases moleculares da resistência bacteriana.....	17
2.1 Mecanismos de resistência aos antimicrobianos.....	17
2.1.1 Alteração da permeabilidade celular ao antimicrobiano.....	18
2.1.2 Remoção do antimicrobiano por bombas de efluxo.....	19
2.1.3 Alteração do sítio de ação do antimicrobiano.....	20
2.1.4 Modificação ou inativação enzimática do agente antimicrobiano.....	20
2.2 Principais mecanismos de transferência horizontal de genes e elementos genéticos móveis.....	25
2.2.1 Conjugação.....	25
2.2.2 Transformação.....	26
2.2.3 Transdução.....	26
2.3 Outras formas de transferência de genes e elementos genéticos móveis.....	26
2.3.1 Transposição.....	26
2.3.2 Integrons.....	27
2.4 Referências bibliográficas.....	28
Capítulo 3: Microrganismos multirresistentes de importância clínica e suas resistências intrínsecas e adquiridas	31
3.1 Introdução.....	31
3.2 Resistência intrínseca.....	33
3.3 Resistência adquirida.....	35
3.3.1 <i>Staphylococcus</i> spp.....	35
3.3.2 <i>Enterococcus</i> spp.....	38
3.3.3 <i>Streptococcus</i> spp.....	41
3.3.4 <i>Enterobacteriales</i>	42
3.3.5 Bacilos Gram-negativos não fermentadores da glicose.....	53
3.3.6 <i>Neisseria</i> spp.....	64
3.3.7 Micobactérias.....	69
3.4 Referências bibliográficas.....	77
Capítulo 4: Teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA)	87
4.1 Método qualitativo: disco-difusão.....	88
4.1.1 Etapas do Ensaio.....	89
4.1.2 Instruções específicas para a leitura do teste de disco-difusão.....	92

4.2	Métodos quantitativos	93
4.2.1	Microdiluição em caldo	93
4.2.2	Fitas de gradiente de concentração de antimicrobianos	97
4.2.3	Ágar diluição	99
4.3	Critérios de interpretação de resultados do TSA	102
4.3.1	Área de Incerteza Técnica (AIT)	103
4.4	Precauções e cuidados especiais na realização do TSA	104
4.5	Pontos críticos	104
4.6	Referências Bibliográficas-	108

APÊNDICE CAPÍTULO 4 109

Capítulo 5: Outros testes para detecção fenotípica de resistência bacteriana aos antimicrobianos 113

5.1	Testes para a detecção de ESBL	113
5.1.1	Métodos alternativos	116
5.2	Testes para a detecção de AmpC	117
5.3	Testes para detecção de carbapenemases	119
5.3.1	Triagem da produção e caracterização de carbapenemases em <i>Enterobacteriales</i> pelo método de disco-difusão	120
5.3.2	Identificação fenotípica de carbapenemases por disco-difusão com inibidores adicionados aos discos de sensibilidade	121
5.3.3	Métodos acidimétricos para detecção de carbapenemases	126
5.3.4	Detecção da hidrólise de carbapenêmicos por espectrometria de massas	128
5.3.5	Testes imunocromatográficos para detecção de carbapenemases	128
5.3.6	Detecção de carbapenemases em sistemas de automação	129
5.4	Testes alternativos para a detecção de resistência às polimixinas	129
5.5	Referências bibliográficas	131

Capítulo 6: Testes genotípicos para a detecção de mecanismos de resistência e avaliação da similaridade genética 141

6.1	Detecção de marcadores genéticos de resistência	141
6.1.1	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	141
6.1.2	Sequenciamento de DNA: Método de Sanger	148
6.2	Métodos para avaliação da epidemiologia molecular de bactérias multirresistentes	150
6.2.3	Metodologias baseadas em padrões de bandas: macrorrestrrição de DNA seguida de PFGE	150
6.2.4	Técnicas baseadas em sequenciamento de genes: MLST	152
6.2.5	Técnicas baseadas em Sequenciamento de Nova Geração	153
6.3	Referências bibliográficas	156

Capítulo 7: Vídeos Ilustrativos 157

APRESENTAÇÃO

A resistência microbiana (RM) aos antimicrobianos é um grave problema mundial, estando associada ao aumento do tempo de internação, dos custos do tratamento e das taxas de morbidade e mortalidade dos pacientes. A RM ocorre quando microrganismos (como bactérias, fungos, vírus e parasitas) mudam quando são expostos aos antimicrobianos (como antibióticos, antifúngicos, antivirais, antimaláricos e anti-helmínticos). Como resultado, os medicamentos tornam-se ineficazes e as infecções persistem no corpo, aumentando o risco de propagação a outras pessoas e de causar sérias complicações e óbitos nos pacientes. A RM ocorre naturalmente ao longo do tempo, geralmente por meio de alterações genéticas, no entanto, o uso indevido e excessivo de antimicrobianos está acelerando esse processo.

A RM é um problema complexo que afeta toda a sociedade e é impulsionada por muitos fatores que estão interligados. Intervenções isoladas possuem impacto limitado. É necessária uma ação coordenada para minimizar o surgimento e a disseminação da RM. O uso indiscriminado e incorreto dos antimicrobianos na comunidade, na agricultura, na criação de animais e nos serviços de saúde são reconhecidamente importantes fatores de risco para o surgimento e a disseminação da RM.

Nesse contexto, insere-se o Laboratório de Microbiologia, que tem como objetivo não apenas apontar o responsável por um determinado estado infeccioso, mas também indicar, por meio do monitoramento de populações microbianas, qual o perfil dos microrganismos que estão interagindo com o organismo humano, possibilitando a indicação de tratamentos mais efetivos. Para o desempenho satisfatório dessa função, é fundamental que os laboratórios de microbiologia possuam estrutura capaz de estabelecer informações sobre a melhor amostra biológica, reconhecer a microbiota e os contaminantes, identificar microrganismos associados à infecção ou com propósitos epidemiológicos, obter resultados em tempo oportuno em casos de emergências, realizar o transporte seguro e rápido das amostras e manter uma educação contínua em relação aos aspectos das infecções relacionadas à assistência à saúde.

Tendo em vista esses aspectos e considerando que a microbiologia é um campo muito dinâmico, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa, em colaboração com especialistas do Brasil, disponibiliza o Módulo 10 – Detecção dos Principais Mecanismos de Resistência Bacteriana aos Antimicrobianos pelo Laboratório de Microbiologia Clínica, da série Microbiologia Clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde, composta por outros nove módulos: Módulo 1 – Biossegurança e manutenção de equipamentos em laboratório de microbiologia clínica; Módulo 2 – Controle externo da qualidade; Módulo 3 – Principais Síndromes Infecciosas; Módulo 4 – Procedimentos laboratoriais: da requisição do exame à análise microbiológica e laudo final; Módulo 5 – Tecnologias em Serviços de Saúde: descrição dos meios de cultura empregados nos exames microbiológicos; Módulo 6 – Detecção e identificação de bactérias de importância médica; Módulo 7 – Detecção e identificação de micobactérias de

importância médica; Módulo 8 – Detecção e identificação de fungos de importância médica e Módulo 9 – Infecções virais.

A Anvisa espera com esta nova publicação contribuir para que os laboratórios de microbiologia possam assimilar e alcançar novos níveis de complexidade laboratorial, atendendo às exigências e características próprias de cada serviço de saúde, além de subsidiar a adoção de procedimentos básicos padronizados nesses serviços que possam, em última instância, fornecer informações mais confiáveis e seguras para apoiar a prática clínica e a tomada de decisão local e nacional para a prevenção e o controle da resistência microbiana nos serviços de saúde do país.

Capítulo 1: Introdução

*Afonso Luís Barth
Juliana Caierão*

A descoberta da penicilina, em 1928, por Alexander Fleming, deu origem à Era dos Antimicrobianos¹. Os anos que se seguiram trouxeram uma euforia generalizada à comunidade científica e médica, perfeitamente justificável, já que houve a descoberta de um número expressivo de novas moléculas com aplicabilidade clínica, fossem elas naturais, semissintéticas ou totalmente sintéticas. De fato, o cenário era tão otimista que pouca atenção foi dada aos primeiros relatos de resistência bacteriana à penicilina e de disseminação, por via horizontal, dessa característica de resistência entre bactérias distintas².

De acordo com Charles Darwin, a premissa básica da evolução é a adaptação, o que, a propósito, as bactérias fazem com maestria. Basta um olhar retrospectivo para os quase 80 anos de uso clínico de antimicrobianos para perceber que as bactérias desenvolveram mecanismos de resistência a virtualmente todos esses compostos, variando apenas o tempo necessário para o aparecimento dos fenótipos de resistência. Esse processo evolutivo culminou no cenário atual, onde coexistimos com bactérias multirresistentes, para as quais opções terapêuticas podem ser escassas ou até mesmo inexistentes^{3,4}.

De fato, enfrentamos hoje uma situação peculiar e preocupante no que diz respeito a infecções por bactérias multirresistentes. De acordo com o macroeconomista britânico Jim O'Neill, caso o panorama atual não sofra alterações consideráveis, infecções por bactérias multirresistentes serão a principal causa de morte no mundo, sendo que, em 2050, 10 milhões de pessoas morrerão anualmente em decorrência dessas infecções, as quais matarão mais que câncer, diabetes e acidentes de trânsito, por exemplo⁵.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) e o “Centers for Disease Control and Prevention” (CDC) norte-americano reconhecem alguns microrganismos como mais relevantes no contexto da multirresistência aos antimicrobianos. Bacilos Gram-negativos resistentes aos carbapenêmicos e *Neisseria gonorrhoeae* resistentes às fluoroquinolonas e às cefalosporinas de terceira geração são apenas alguns desses exemplos (que serão discutidos no Capítulo 3 deste módulo) e demonstram que a problemática da resistência bacteriana engloba não somente infecções classicamente relacionadas à assistência à saúde, mas, também, a infecções comunitárias.

A ocorrência e emergência de bacilos Gram-negativos multirresistentes tem se revelado um importante desafio para os serviços de saúde exigindo um grande esforço de gestores e profissionais de saúde de todas as especialidades na busca de medidas inovadoras e eficazes de prevenção e controle desses microrganismos⁶.

No Brasil, de acordo com dados do Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 20 (Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência microbiana do ano de 2018), *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas aeruginosa* estão entre os principais microrganismos causadores de infecções primárias de corrente sanguínea relacionadas à infecção de cateter venoso central confirmadas laboratorialmente em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) adulto. Corroborando com o panorama mundial, em nosso país, a resistência aos carbapenêmicos é o principal desafio entre esses microrganismos, sendo que aproximadamente 79%, 44,30% e 41,40% dos *Acinetobacter* spp., *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* foram resistentes aos carbapenêmicos, respectivamente, conforme dados do Boletim citado acima⁷.

São várias e graves as consequências de infecções por essas e outras bactérias multirresistentes, incluindo aumento de morbidade e mortalidade, maior tempo de hospitalização e aumento dos custos com os cuidados com a saúde. Reconhecendo e preocupada com esse cenário, a OMS tem, frequentemente, ressaltado o tema da multirresistência aos antimicrobianos, por meio do lançamento de campanhas e de programas de vigilância epidemiológica. Um desses programas é o “Global Antimicrobial Resistance Surveillance System” (GLASS), uma plataforma para o compartilhamento de dados sobre resistência aos antimicrobianos em nível mundial. A OMS tem incentivado a participação de todos os países com o objetivo de obter um panorama global da resistência bacteriana aos antimicrobianos. São peças-chave desse programa os sistemas de vigilância nacionais, bem como os laboratórios de bacteriologia nacionais de referência. Reconhecer a epidemiologia mundial de infecções associadas a microrganismos multirresistentes é essencial em um contexto onde o fluxo de pessoas e mercadorias ocorre em uma intensidade sem precedentes. Até outubro de 2019, 88 países já haviam aderido ao GLASS, inclusive o Brasil⁸.

De fato, nos últimos anos, esforços foram feitos para que sistemas de vigilância da resistência microbiana no Brasil se tornassem mais robustos, já que a subnotificação é um desafio que precisa ser vencido. Nesse sentido, em 2005 a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) criou a Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde (Rede RM), com o objetivo de tornar a assistência à saúde mais efetiva por meio da detecção, prevenção e controle da emergência de resistência aos antimicrobianos em serviços de saúde no Brasil. Já, em 2013, a Anvisa e o Ministério da Saúde (MS) instituíram a Sub-rede Analítica de Resistência Microbiana em Serviços de Saúde (Sub-rede RM) com o objetivo de estabelecer, ao longo do tempo, o histórico evolutivo das cepas multirresistentes de infecções relacionadas à assistência à saúde humana. Todos esses esforços têm culminado em uma maior notificação da ocorrência de bactérias multirresistentes, fazendo com que os dados epidemiológicos nacionais estejam se tornando mais sistemáticos nos últimos anos.

É imprescindível ressaltar que não apenas a ampla utilização de antimicrobianos em medicina humana tem atuado como pressão seletiva para a emergência e disseminação de bactérias multirresistentes. O uso de antimicrobianos em medicina veterinária e, também, na agropecuária são fatores determinantes que reforçam o cenário atual de alta prevalência de bactérias resistentes aos antimicrobianos. É nesse contexto que, nos últimos anos, tem sido salientado o conceito de Saúde Única (“One Health”), definido como um esforço integrativo de diferentes áreas atuando localmente, nacionalmente e globalmente para obter uma saúde ótima para pessoas, animais e o meio ambiente^{9,10}.

Realmente, é necessário que se tenha uma visão holística da problemática da resistência bacteriana aos antimicrobianos. Isso porque 2/3 de todos os antimicrobianos consumidos no mundo são utilizados no contexto agropecuário e veterinário, como agentes terapêuticos e/ou profiláticos funcionando como promotores de crescimento. Muitas vezes, esses antimicrobianos são utilizados em doses subterapêuticas, favorecendo a seleção de bactérias resistentes que, eventualmente, são transmitidas aos humanos, seja de forma direta (por contato/manipulação) ou indireta (produtos alimentares, solo e água contaminada)^{9,10}.

Entendendo a importância fundamental desse olhar global sobre a questão da resistência aos antimicrobianos, o Ministério da Saúde, em parceria com a Anvisa e outros órgãos nacionais, publicou, em 2018, o Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única (2018-2022), o PAN-BR¹¹. Esse plano foi elaborado em convergência com os objetivos definidos pela aliança tripartite entre a OMS, a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) e a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), e tem como um dos objetivos garantir que se mantenha a capacidade de tratar e prevenir infecções com antimicrobianos seguros e eficazes, com qualidade assegurada e utilizados de

forma responsável, no contexto da Saúde Única. Para tal, foram estabelecidos pelo PAN-BR 14 objetivos principais, com 33 intervenções estratégicas e 75 atividades, englobando profissionais e gestores com atuação nas áreas de saúde humana, animal e ambiental. A participação de gestores é fundamental para que programas de Saúde Única sejam implementados de forma efetiva e para que os objetivos traçados pelo PAN-BR sejam alcançados.

Nesse sentido, foi proposto pela Secretaria de Vigilância em Saúde a criação do BR-GLASS – Programa Nacional de Monitoramento da Resistência Antimicrobiana no Brasil. O programa está previsto no Objetivo 4 do PAN-BR, item 4.2.3. (Desenvolver um sistema nacional de informação integrada para a vigilância e monitoramento da resistência aos antimicrobianos), cujo propósito é complementar às ações da Anvisa citadas anteriormente, uma vez que pretende avaliar o perfil de sensibilidade de todos os isolados dos hospitais sentinela, tanto de origem nosocomial como comunitários. A vigilância integrada e a abordagem em Saúde Única são as tônicas do Programa, que iniciou o Projeto-Piloto no Paraná em 2019 e deve ser expandido para outros quatro estados em 2020, com o objetivo de atingir 95 hospitais sentinela até 2022¹¹.

As bactérias apresentam mecanismos de resistência complexos, que envolvem a diminuição da concentração intracelular do antimicrobiano, a alteração nos sítios de ligação dessa molécula na célula bacteriana, ou a produção de enzimas que alteram ou degradam o antimicrobiano. Tais mecanismos estão associados a genes localizados nos cromossomos ou plasmídeos bacterianos e que apresentam formas distintas de expressão e de transmissão entre as bactérias. Essa transmissão ocorre entre os diferentes ecossistemas (humanos, animais e meio ambiente), ressaltando, novamente, a importância da abordagem da Saúde Única¹². Os mecanismos moleculares da resistência bacteriana e sua disseminação serão discutidos em detalhes no Capítulo 2.

Diante do cenário apresentado, nunca o laboratório de Microbiologia Clínica foi tão exigido no que diz respeito aos resultados dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos. Assim, microbiologistas devem ser capazes de reconhecer e utilizar as metodologias mais adequadas e padronizadas para obtenção de resultados acurados, a fim de, efetivamente, auxiliar no tratamento e na prevenção da disseminação de infecções bacterianas. Da mesma forma, gestores devem estar cientes da problemática da resistência bacteriana aos antimicrobianos, para que compreendam a necessidade de investimentos constantes, sempre sendo capazes de avaliar criticamente o custo-benefício dos investimentos.

É importante, por exemplo, que os laboratórios tenham ferramentas que permitam o correto gerenciamento dos dados no contexto da vigilância epidemiológica. Assim, a partir de uma parceria da Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública (CGLAB) com o Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS)

e a Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), foi criado o sistema Gerenciador de Ambiente Laboratorial (GAL), com o objetivo de informatizar os Laboratórios de Vigilância Epidemiológica e Vigilância em Saúde Ambiental, proporcionando gerenciamento das rotinas, o acompanhamento das etapas para realização dos exames e a obtenção de relatórios epidemiológicos.

Em relação às técnicas de determinação da sensibilidade das bactérias aos antimicrobianos, experimentos de diluição de antimicrobianos em caldo e em ágar foram uma das primeiras ferramentas utilizadas na prática da microbiologia, iniciado em 1870. Nos anos 1940, essas técnicas foram aprimoradas e, posteriormente, padronizadas e recomendadas pelos comitês de padronização ao redor do mundo, permitindo a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antimicrobianos. Entretanto, têm a desvantagem de serem tecnicamente trabalhosas para serem realizadas rotineiramente no laboratório de Microbiologia Clínica, especialmente aqueles com alta demanda¹³.

Por sua vez, o teste de disco-difusão, desde a sua descrição original (na década de 1920) até a forma que conhecemos e utilizamos atualmente, passou por inúmeras modificações, tendo a contribuição de diferentes autores. Vários métodos foram propostos, todos apresentando limitações importantes, especialmente no que dizia respeito à reprodutibilidade. Até que, em 1966, Kirby & Bauer estabeleceram uma metodologia confiável e padronizada para ser utilizada para determinar a sensibilidade das bactérias aos antimicrobianos. O teste de “Kirby & Bauer” ainda é o método mais rotineiramente utilizado mundialmente, por ser de fácil execução, baixo custo e por responder, de forma geral, às necessidades da equipe médica¹³.

⇒ Em 1991, foi desenvolvido o primeiro método comercial (Teste Epsilométrico – Etest[®]) baseado em fitas plásticas não porosas com um gradiente de concentração de antimicrobianos, o qual permite determinar a CIM dos antimicrobianos sem a necessidade de uso de técnicas de diluição. Atualmente, existem outras empresas que também fabricam fitas com gradientes de concentração de antimicrobianos, utilizando o mesmo princípio do Etest. Metodologicamente fácil de executar, essa técnica é, na maioria das situações clínicas, uma forma muito prática de realização de teste quantitativo (determinação de CIM)¹³. As peculiaridades dos testes citados, bem como as metodologias detalhadas e suas limitações, serão discutidas no Capítulo 4.

Nem todos os testes descritos até aqui são adequados para todas as bactérias. A sensibilidade às polimixinas em enterobactérias, por exemplo, não é determinada, de forma confiável utilizando-se o teste de disco-difusão ou as fitas de gradiente de concentração, e isso se deve às características moleculares do antimicrobiano¹⁴. Além disso, algumas situações clínicas ou epidemiológicas podem exigir a caracterização de

mecanismos de resistência específicos, e, para isso, testes adicionais são necessários. Assim, por exemplo, o teste de disco-difusão define se uma determinada bactéria é resistente a um carbapenêmico, mas não é capaz de elucidar se essa resistência está ou não associada à produção de carbapenemases (enzimas que hidrolisam carbapenêmicos), muito menos estabelecer qual o tipo de enzima está sendo produzido¹⁵. Essas e outras particularidades serão oportunamente discutidas ao longo do Capítulo 5.

A exemplo da descoberta dos antimicrobianos, a Biologia Molecular foi outro avanço notável ocorrido no século passado nas ciências médicas. Muitas das técnicas moleculares foram utilizadas experimentalmente na Microbiologia Clínica e, com o passar dos anos, algumas demonstraram aplicabilidade limitada, enquanto outras se consolidaram como ferramentas úteis para os laboratórios.

A Reação em Cadeia da Polimerase (“Polymerase Chain Reaction” – PCR) pode ser utilizada, por exemplo, para identificação rápida e acurada de marcadores genéticos específicos de resistência. A técnica de PCR é uma metodologia que requer equipamentos e materiais de consumo que nem sempre estão disponíveis em laboratórios de microbiologia e, por isso, não é utilizada na rotina da maioria dos laboratórios. Compreender as vantagens e limitações dessa e de outras metodologias moleculares é essencial para a utilização assertiva desses métodos¹⁶.

As ferramentas de Biologia Molecular também podem ser utilizadas para compreender e, eventualmente, evitar a disseminação dos microrganismos multirresistentes. Atualmente, vivemos em um mundo globalizado e o trânsito de pessoas e mercadorias facilitou, sobremaneira, a disseminação desses microrganismos. Nesse contexto, metodologias têm sido utilizadas para avaliar a relação genética entre bactérias envolvidas em infecções, com o objetivo de compreender a dinâmica de disseminação delas e/ou de seus determinantes genéticos de resistência. Alguns microrganismos multirresistentes, por exemplo, apresentam predominantemente uma expansão clonal, de abrangência mundial. É o caso da *K. pneumoniae* ST258, um clone bacteriano altamente adaptado ao ambiente hospitalar, associado à resistência aos carbapenêmicos e endêmico em várias regiões do mundo, incluindo o Brasil¹⁷. As ferramentas utilizadas para a determinação da epidemiologia molecular de microrganismos resistentes serão descritas no Capítulo 6, desde a tipagem por PFGE (“Pulsed-Field Gel Electrophoresis”) e MLST (“MultilocusSequenceTyping”) até o sequenciamento do genoma completo.

Por fim, compõem este Módulo, materiais ilustrativos, no formato de vídeos com apresentação prática dos principais tópicos aqui abordados. Assim, espera-se que este documento possa contribuir para uma melhor compreensão do fenômeno da resistência bacteriana e para reforçar o papel do laboratório de Microbiologia nesse

processo, escolhendo e executando de forma adequada as metodologias atualmente disponíveis.

Diante do exposto, fica claro que a resistência bacteriana aos antimicrobianos é um problema de abrangência mundial, que coloca em risco a saúde humana. Para o enfrentamento adequado desse cenário, uma abordagem pautada na saúde única é essencial. Nesse contexto, se torna imprescindível a participação de profissionais da saúde, juntamente com gestores, para que se tenham sistemas de vigilância epidemiológica robustos e para que medidas efetivas de prevenção e controle das infecções por essas bactérias possam ser estabelecidas. Laboratórios de Microbiologia têm papel fundamental em todo esse contexto, já que a detecção acurada do perfil de sensibilidade das bactérias aos antimicrobianos, bem como de seus mecanismos de resistência, são essenciais para que todas as demais providências possam ser tomadas.

1.1 Referências bibliográficas

1. Fleming, A. On antibacterial action of culture of penicillium, with special reference to their use in isolation of *B. influenzae*, *Br J Exp Pathol.* 1929; 10: 226-236.
2. Aminov R. History of antimicrobial drug discovery: Major classes and health impact. *Biochem Pharmacol.* 2017; 133:4-19.
3. Holmes, AH; Moore, LSP; Sundsfjord, A; Steinbakk, M *et al.* Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *Lancet*, 2016; 387 (10014): 176-187.
4. Klein EY, Van Boeckel TP, Martinez EM, Pant S, Gandra S, Levin SA, *et al.* Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. *Proc Natl Acad Sci.* 2018;115(15): e3463–70.
5. Jim O’Neill. Antimicrobial Resistance: tacking a crisis for the health and wealth of nations. 2014. Disponível em <https://wellcomecollection.org/works/rdpck35v>.
6. Perez F, Bonomo RA. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: global action required. *Lancet Infect Dis.* 2019;19(6):561–2.
7. Brasil, Anvisa. Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 20: Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência microbiana do ano de 2018.
8. World Health Organization. Global Antimicrobial Resistance Surveillance System: Manual for Early Implementation. 2015.
9. Ryu S; Kim BI; Lim JS; Tan CS; Chun BC. One Health Perspectives on Emerging Public Health Threats. *J Prev Med Public Health*, 2017; 50: 411-414.

10. McEwen SA & Collignon PJ. Antimicrobial Resistance: A One Health Perspective. *Microbiol Spectr.* 2017; 6(2): ARBA-0009-2017.
11. Brasil, Ministério da Saúde. Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única, 2018-2022. 2018.
12. Munita JM & Arias CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol. Spectrum* 2016; doi: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.
13. Khan ZA, Siddiqui MF, Park S. Current and Emerging Methods of Antibiotic Susceptibility Testing. *Diagnostics.* 2019;9(2):49.
14. Teo JQ-M, Chang CW-T, Leck H, Tang C-Y, Lee SJ-Y, Cai Y, *et al.* Risk factors and outcomes associated with the isolation of polymyxin B and carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: A case–control study. *Int J Antimicrob Agents.* 2019;53(5):657–62.
15. Tamma PD & Simner PJ. Phenotypic Detection of Carbapenemase-Producing Organisms from Clinical Isolates. *J Clin Microbiol.* 2018; 56:e01140-18.
16. Bilozor A, Balode A, Chakhunashvili G, Chumachenko T, Egorova S, *et al.* Application of Molecular Methods for Carbapenemase Detection. *Frontiers in Microbiology.* 2019; 10:1755.
17. DeLeo FR, Chen L, Porcella SF, Martens CA, Kobayashi SD *et al.* Molecular dissection of the evolution of carbapenem-resistant multilocus sequence type 258 *Klebsiella pneumoniae*. *PNAS.* 2014; 11: 4988-4993.

Capítulo 2:

Bases moleculares da resistência bacteriana

Ana Paula D' Alincourt Carvalho Assef
Orlando Carlos da Conceição Neto

Entende-se por resistência bacteriana a capacidade de um microrganismo de se desenvolver *in vitro* na presença da concentração alcançada pelo antimicrobiano na corrente sanguínea, após administração de dose padrão.

As bactérias podem apresentar resistência intrínseca ou adquirida aos antimicrobianos. **Resistência intrínseca** é a característica inata de determinada espécie ou gênero bacterianos onde todos os indivíduos de um mesmo gênero ou espécie apresentam resistência a um determinado agente antimicrobiano, devido a particularidades estruturais ou funcionais¹.

Resistência adquirida ocorre quando uma bactéria previamente sensível a determinado antimicrobiano desenvolve resistência, podendo ser consequência de mutações em genes cromossômicos ou de aquisição de elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposons que contenham genes associados à resistência, por transferência horizontal de genes¹.

2.1 Mecanismos de resistência aos antimicrobianos

A resistência aos antimicrobianos pode ocorrer por diferentes mecanismos, tais como: alteração da permeabilidade celular ao antimicrobiano; expulsão do antimicrobiano por bombas de efluxo; alteração do sítio de ação do antimicrobiano e inativação enzimática do agente antimicrobiano. Esses mecanismos podem coexistir em uma mesma cepa bacteriana, tornando-a resistente a diferentes classes de antimicrobianos, gerando um perfil de multirresistência^{1,2}. A seguir, esses mecanismos serão discutidos detalhadamente.

2.1.1 Alteração da permeabilidade celular ao antimicrobiano

A permeabilidade da membrana celular é essencial para que o antimicrobiano tenha acesso a seu sítio de ação. Alterações nessa permeabilidade podem levar a uma diminuição da concentração do antimicrobiano dentro da célula bacteriana².

A membrana externa das bactérias Gram-negativas é a primeira linha de defesa contra compostos tóxicos, tais como os antimicrobianos. Devido à permeabilidade limitada da membrana externa, que é uma característica inata, os bacilos Gram-negativos são intrinsecamente resistentes a vários antimicrobianos como penicilina, eritromicina, clindamicina e vancomicina².

A entrada de muitos antimicrobianos, como por exemplo os β -lactâmicos, na célula bacteriana é controlada pelas porinas, que são proteínas de membrana externa – “Outer Membrane Proteins” (OMPs) – capazes de formar canais constituídos de água no seu interior, o que permite a difusão passiva de solutos hidrofílicos através da membrana externa. Assim, algumas bactérias podem desenvolver resistência adquirida a determinados antimicrobianos por meio de mutações nos genes codificadores ou reguladores de determinadas porinas, levando à redução dos níveis de expressão ou alteração da estrutura dessas proteínas, o que limita a entrada do antimicrobiano. Geralmente, essas mutações conferem um aumento da concentração inibitória mínima (CIM) do antimicrobiano, mas muitas vezes esse aumento não é suficiente para que seja observada uma resistência clínica ao composto^{3,4}.

Um exemplo é o desenvolvimento de resistência ao imipenem em *Pseudomonas aeruginosa* devido a mutações no gene que codifica a porina OprD (responsável pela entrada desse antimicrobiano dentro da célula bacteriana). A diminuição ou ausência da expressão desta porina confere resistência de baixo ou moderado nível ao imipenem. Nesses casos, também ocorre o aumento da CIM para o meropenem, mas não em níveis suficientes para causar resistência, e a bactéria continua sendo classificada como sensível ao meropenem⁵.

Algumas vezes, as alterações na expressão de determinadas porinas podem levar à resistência a diferentes classes de antimicrobianos, tornando a bactéria multirresistente. Isso porque uma mesma porina pode servir de canal de acesso ao interior da célula por diferentes compostos antimicrobianos. Como exemplo, em *Klebsiella pneumoniae* tem sido descrito que mutações nos genes que codificam as porinas OmpK35 e OmpK36 causam diminuição da sensibilidade a alguns β -lactâmicos como os carbapenêmicos, mas também às fluoroquinolonas, ao cloranfenicol e à tetraciclina^{4,6}.

No entanto, a associação da diminuição da permeabilidade com outros mecanismos de resistência pode conferir maiores níveis de resistência, pois as mutações e/ou as alterações na expressão de porinas atuam limitando a entrada de um antimicrobiano dentro da célula, permitindo uma melhor ação de outros mecanismos de resistência, como bombas de efluxo e degradação enzimática. Por exemplo, *Serratia marcescens* pode se tornar resistente ao meropenem pela perda da porina OmpF associada à hiperexpressão da β -lactamase Amp^C.

2.1.2 Remoção do antimicrobiano por bombas de efluxo

Os sistemas de efluxo atuam na remoção de compostos tóxicos de dentro da célula bacteriana. O aumento da expressão desses sistemas é um importante mecanismo de resistência aos antimicrobianos podendo causar resistência simultânea a diferentes classes de antimicrobianos (multirresistência). Ao contrário da diminuição da permeabilidade celular (mecanismo presente exclusivamente em bactérias Gram-negativas), os sistemas de efluxo podem estar presentes em micobactérias, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sendo mais relevante neste último grupo de bactérias².

Os sistemas de efluxo são formados por transportadores proteicos que funcionam através de consumo de energia. Em Gram-positivos são constituídos por um único polipeptídeo localizado na membrana citoplasmática. Já em Gram-negativos, a maioria dos sistemas é composto por três proteínas, uma inserida na membrana citoplasmática, outra na membrana externa e uma proteína de ligação no espaço periplasmático⁸.

Existem cinco grandes famílias de sistemas de efluxo classificadas de acordo com a fonte de energia utilizada, a relação filogenética e a especificidade de substratos: ABC (“ATP Binding Cassette”), MFS (“Major Facilitator Superfamily”), SMR (“Small Multidrug Resistance”), MATE (“Multidrug and Toxic Compound Extrusion”) e RND (“Resistance-Nodulation Division”). Os sistemas de efluxo da família ABC utilizam a hidrólise de ATP (adenosina trifosfato) como fonte de energia, enquanto as outras famílias usam a força motriz de prótons⁸. Dentre as cinco grandes famílias, a que mais se destaca na resistência aos antimicrobianos em bactérias Gram-negativas é a família RND⁹.

Enquanto alguns sistemas de efluxo são específicos para um determinado substrato, como TetA e CmlA que expulsam apenas tetraciclina e cloranfenicol, respectivamente, outros sistemas podem exportar uma gama de substratos distintos como, por exemplo, o sistema de efluxo MexAB-OprM de *P. aeruginosa*, que quando hiperexpresso, pode gerar resistência aos β -lactâmicos, quinolonas, tetraciclina e cloranfenicol⁸.

A maioria dos sistemas de efluxo é codificada por genes cromossômicos, porém alguns são adquiridos em elementos genéticos móveis, como é o caso do gene *qepA*, que codifica uma bomba de efluxo em *K. pneumoniae* e tem sido associada à resistência às quinolonas⁸.

2.1.3 Alteração do sítio de ação do antimicrobiano

Cada antimicrobiano possui um alvo específico na célula bacteriana para realizar a sua ação e essa interação (antimicrobiano/sítio de ação) é muito específica. Assim, alterações nos sítios de ação fazem com que a bactéria se torne resistente ao antimicrobiano. Essas alterações podem ocorrer por (i) mutações em genes que codificam as proteínas-alvo, levando a ausência, alteração da estrutura ou da expressão do sítio de ação; ou (ii) por aquisição de genes que codificam alguma proteção ao sítio de ação².

A resistência à oxacilina em *Staphylococcus* spp. é um exemplo desse tipo de mecanismo de resistência. O gene *mecA* codifica uma nova transpeptidase, denominada PBP2a (“Penicillin-Binding Protein” 2a) ou PBP2', que possui baixa afinidade pelos β -lactâmicos. Esta PBP é suficiente para manter a integridade da parede celular durante o crescimento bacteriano, enquanto as outras PBPs constitutivas são inativadas pelos β -lactâmicos^{10,11}. Outro exemplo de alteração no sítio de ligação ocorre na resistência às polimixinas. Por mutações em genes cromossômicos ou aquisição de genes plasmidiais (*mcr*), a porção do lipídeo A do lipopolissacarídeo das bactérias Gram-negativas sofre uma redução nas cargas negativas, diminuindo ou impedindo a ligação das polimixinas, que são antimicrobianos catiônicos, ao seu alvo¹².

2.1.4 Modificação ou inativação enzimática do agente antimicrobiano

A modificação/inativação enzimática do antimicrobiano é o principal mecanismo de resistência em bacilos Gram-negativos. Têm sido descritas milhares de enzimas que podem degradar ou modificar antimicrobianos de diferentes classes. Existem três estratégias químicas que as enzimas utilizam para promover a inativação do antimicrobiano: transferência de grupos químicos (que ocorre em diferentes classes de fármacos), mecanismos de oxidação (que ocorre com as tetraciclinas) e hidrólise (que ocorre principalmente com os β -lactâmicos)².

Enzimas que inativam antimicrobianos através da transferência de grupos químicos, incluindo fenômenos de fosforilação, glicosilação, ribosilação e transferência de grupos thiol, são bastante comuns causando resistência aos aminoglicosídeos, cloranfenicol e macrolídeos, por exemplo. Um dos principais grupos de enzimas que modificam antimicrobianos são as enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EMAs), que alteram a estrutura química

desses compostos, inativando a sua ligação com as subunidades do ribossomo (sítio de ação na bactéria). Geralmente as EMAs conferem resistência a altas concentrações de aminoglicosídeos. Existem três principais classes de EMAs: acetiltransferases, fosfotransferases e nucleotidiltransferases. Essas classes são evolutivamente diversas e variam em relação aos aminoglicosídeos que podem modificar e à região da molécula que será modificada^{1,2}.

⇒ **β-lactamases**

As β-lactamases são as enzimas de maior importância clínica. Constituem um grupo diverso de enzimas e estão amplamente distribuídas entre bactérias Gram-positivas e negativas, sendo o mais importante mecanismo de resistência aos β-lactâmicos em bactérias Gram-negativas. Esse fato se deve ao acúmulo dessas enzimas no espaço periplasmático das bactérias Gram-negativas, enquanto em Gram-positivas essas enzimas são liberadas para o meio externo. Isso faz com que a inativação do antimicrobiano seja mais efetiva em Gram-negativos, antes de sua ligação às PBPs na membrana citoplasmática^{13,14}.

O mecanismo de ação dessas enzimas é a hidrólise do anel β-lactâmico, presente no núcleo estrutural de todos os β-lactâmicos. Os genes codificadores de β-lactamases podem possuir localização cromossômica ou plasmidial e muitas vezes estão associados a outros elementos genéticos móveis, como integrons, transposons e sequências de inserção. A localização desses genes nesses elementos com mobilidade facilita sua disseminação¹³.

Diferentes tipos de β-lactamases já foram descritos e inúmeras tentativas de estabelecer um sistema de classificação foram propostas. Atualmente, têm sido consideradas duas classificações: A classificação de Ambler (1980)¹⁵, com base na estrutura molecular e na sequência de aminoácidos, resultando em quatro grandes classes (A, B, C e D); e a classificação de Bush & Jacoby (2010) que é baseada na atividade enzimática relacionando substrato preferencial e características estruturais^{14,16}.

As β-lactamases de classe A possuem serina no sítio de ação e são chamadas de serino-β-lactamases. Englobam as penicilinases, a maioria das β-lactamases de espectro estendido (“Extended-Spectrum β-Lactamases” – ESBLs) e as serino-carbapenemases, como a KPC (“*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase”). As penicilinases são enzimas com capacidade de hidrólise restrita, agindo apenas sobre as penicilinas. Alguns exemplos de enzimas dessa classe são as penicilinases produzidas por *Staphylococcus* spp. e *Enterococcus* spp. (PC1)¹³.

As ESBLs são capazes de hidrolisar todas as penicilinas, as cefalosporinas incluindo as de terceira e quarta gerações e monobactâmicos. A grande maioria das β -lactamases desse grupo é susceptível à ação de inibidores de β -lactamases, tais como o ácido clavulânico, o sulbactam ou o tazobactam. Atualmente, existem mais de 500 diferentes ESBLs descritas, sendo a maioria derivada das enzimas CTX-M, TEM e SHV, principalmente em *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e outras espécies de *Enterobacteriales*¹³.

As carbapenemases de classe A são divididas em quatro representantes principais: GES (43 variantes, algumas com atividade de ESBL e outras com atividade de carbapenemase, como por exemplo GES-2, GES-4, GES-5, GES-8, GES-11, GES-16, GES-18, GES-19 e GES-20), SME (5 variantes), IMI/NMC (18 variantes) e KPC (46 variantes). Algumas dessas variantes foram descritas pela primeira vez no Brasil, como é o caso da GES-16. As carbapenemases hidrolisam uma ampla variedade de antimicrobianos β -lactâmicos, incluindo os carbapenêmicos, cefalosporinas, penicilinas e monobactâmicos (aztreonam) e podem ser inibidas pelo ácido clavulânico e tazobactam^{13,17,18}. As enzimas do tipo KPC são as de maior importância clínica e epidemiológica. De fato, KPC-2 é a carbapenemase mais comumente detectada mundialmente, sendo que, no Brasil, essa variante é endêmica¹⁷. Tais enzimas apresentam elevada capacidade hidrolítica contra carbapenêmicos e são rapidamente disseminadas por elementos genéticos móveis, justificando seu caráter endêmico^{18,19}.

As enzimas da classe C também são denominadas de AmpC β -lactamase. Geralmente têm localização cromossômica, mas existem enzimas AmpC plasmidiais. Os microrganismos que hiperexpressam AmpC são tipicamente resistentes às penicilinas, às combinações de β -lactâmicos com inibidores de β -lactamases e às cefalosporinas de primeira e terceira gerações, mas geralmente mantêm a sensibilidade às cefalosporinas de quarta geração (cefepima), quando não existe associação com outros mecanismos, como a alteração nas proteínas de membrana externa. Algumas espécies de bactérias possuem intrinsecamente genes que codificam AmpC que são induzíveis na presença de beta-lactâmicos¹³. As principais enterobactérias que possuem AmpC induzível incluem *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp., *Serratia marcescens* e *Providencia* spp, um grupo tradicionalmente conhecido pela sigla “CESP”. A sigla “MYSPACE” também é utilizada visto que outras bactérias como *Morganella morganii*, *Yersinia* sp, *Aeromonas* sp e *Pseudomonas aeruginosa* também podem apresentar AmpC induzível.

Por sua vez, as β -lactamases de classe B são chamadas de metalo- β -lactamases (MBLs). São caracterizadas por apresentarem um ou dois átomos de

zinco em seu sítio de ação, o que faz com que sejam inibidas por quelantes como o EDTA ou compostos derivados do ácido tióico. Essas β -lactamases são capazes de hidrolisar todos os β -lactâmicos, com exceção dos monobactâmicos, possuindo uma alta atividade contra os carbapenêmicos além de serem resistentes aos inibidores de β -lactamases, como sulbactam e clavulanato. Como todas as β -lactamases, as MBLs podem ser codificadas por genes localizados no cromossomo bacteriano ou transferidos através de elementos genéticos móveis. As famílias mais comuns de MBLs relatadas em isolados clínicos incluem as subclasses VIM (incluindo 67 variantes), IMP (79 variantes), GIM (2 variantes), SIM (2 variantes), NDM (20 variantes) e SPM (1 variante) (13,17,19). A SPM foi descrita pela primeira vez no Brasil em 2002, de um isolado recuperado em 1999, e tem sido descrita como a principal MBL em amostras brasileiras de *P. aeruginosa* devido à disseminação de um clone endêmico, ST 277, em hospitais brasileiros²⁰.

As β -lactamases de classe D ou oxacilinas (OXA) possuem uma serina em seu sítio de ação. Dentre elas, há enzimas com perfil de penicilinas, que hidrolisam penicilinas e cloxacilina (ex.: OXA-1), perfil de ESBLs, que hidrolisam cefalosporinas de amplo espectro (ex. OXA-15) e também com perfil de carbapenemases (ex.: OXA-23 e OXA-48). Essas enzimas são fracamente inibidas pelo ácido clavulânico^{13,17,19}.

Tabela 1. Classificação das β -lactamases (adaptado de Bush and Fisher, 2011¹⁶)

Grupo Funcional	Classe Molecular	Exemplos	Características	Inibida por ácido clavulânico ou tazobactam	Inibida por EDTA
1	C	AmpC de <i>E. coli</i> e <i>P. aeruginosa</i> , CMY-2, FOX-1, MIR-1	Cefalosporinases AmpC cromossômicas e plasmidiais Hidrolisam cefalosporinas e cefamicinas.	Não	Não
1e	C	GC1, CMY-37	Hidrolisam penicilinas, cefamicinas, cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos.	Não	Não
2a	A	PC1 e outras penicilinases de <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Enterococcus</i> spp.	Penicilinases	Sim	Não
2b	A	SHV-1, TEM-1, TEM-2, TEM-90	Hidrolisam penicilinas e cefalosporinas de primeira geração (cefazolina e cefalotina).	Sim	Não
2be	A	CTX-M-15, CTX-M-44, PER-1, SFO-1, SHV-5, TEM-10, TEM-26	ESBLs – Hidrolisam penicilinas, cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos.	Sim	Não
2br	A	TEM-30, TEM-76, TEM-103, SHV-10, SHV-26	Enzimas que hidrolisam penicilinas e cefalosporinas de primeira geração.	Não	Não
2ber	A	TEM-50, TEM-68, TEM-89	ESBLs – Hidrolisam penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos.	Não	Não
2c	A	PSE-1, CARB-3	Hidrolisam penicilinas e carbenicilina.	Sim	Não
2d	D	OXA-1, OXA-10	Hidrolisam a cloxacilina e oxacilina.	Variável	Não
2de	D	OXA-11, OXA-15	Hidrólise de penicilinas e cefalosporinas de amplo espectro.	Variável	Não
2df	D	OXA-23, OXA-48	Carbapenemases – Hidrolisam carbapenêmicos e outros β -lactâmicos	Variável	Não
2e	A	CepA	Cefalosporinases	Sim	Não
2f	A	IMI-1, KPC-2, KPC-3, SME-1, GES-2	Carbapenemases – Hidrolisam carbapenêmicos e outros β -lactâmicos	Sim	Não
3a	B	IMP-1, L1, NDM-1, VIM-1, SPM-1	Carbapenemases – Hidrolisam todos os β -lactâmicos exceto monobactâmicos.	Não	Sim
3b	B	CphA, Sfh-1	Carbapenemases – Hidrolisam preferencialmente carbapenêmicos.	Não	Sim

2.2 Principais mecanismos de transferência horizontal de genes e elementos genéticos móveis

Embora os eventos de mutação contribuam para a evolução e adaptação bacteriana, a transferência horizontal de genes é a principal responsável pela rápida proliferação de genes de resistência aos antimicrobianos entre bactérias, podendo haver transferência entre microrganismos de uma mesma espécie e também entre espécies e gêneros distintos. A transferência horizontal de genes ocorre através da conjugação, da transformação ou da transdução e envolve diferentes elementos genéticos móveis como plasmídeos, transposons, sequências de inserção, integrons, bacteriófagos e ilhas genômicas²¹⁻²³.

2.2.1 Conjugação

O mecanismo mais comum pelo qual os genes de resistência são transferidos entre as bactérias é a conjugação, que é mediada por plasmídeos. Para que aconteça a conjugação, é necessário contato célula a célula, através de um *pilus* sexual especializado, codificado por um plasmídeo conjugativo. Após o contato, uma das fitas do DNA plasmidial passa para a célula receptora através do *pilus*. A fita simples começa a ser replicada à medida que entra na célula. Ao final do processo, as duas células bacterianas terão uma cópia do plasmídeo conjugativo completo²⁴.

Plasmídeos são DNAs extracromossômicos circulares e autorreplicantes. Há uma grande variabilidade quanto ao tamanho dos plasmídeos, expresso em número de pares de bases. Os plasmídeos podem ter de 1 a >100kbp. Embora sejam geralmente acessórios, os genes transportados por esses elementos genéticos são, em algumas condições, fundamentais para a sobrevivência e o crescimento da célula bacteriana. Entre as características mais observadas conferidas por plasmídeos, encontram-se: resistência aos antimicrobianos, resistência aos metais pesados e a outros agentes tóxicos, produção de toxinas, dentre outras^{21,25}.

Vários genes de resistência aos antimicrobianos são carregados por plasmídeos, como por exemplo, os genes que codificam as ESBL, e os genes codificadores das carbapenemases (bla_{KPC} , bla_{NDM} , bla_{SPM} e bla_{OXA}). Além disso, muitas vezes esses plasmídeos carregam também determinantes de resistência para outros grupos de antimicrobianos como quinolonas, sulfonamidas, trimetoprima, cloranfenicol, tetraciclinas e aminoglicosídeos, tornando a cepa bacteriana multirresistente²¹⁻²³.

2.2.2 Transformação

Na transformação, há a captação de DNA do meio extracelular pelas células bacterianas. Para que ocorra a transformação, são necessárias algumas condições: o DNA precisa estar livre no meio extracelular; a bactéria receptora precisa ser capaz de internalizar (estar em estado de competência) o DNA livre e este precisa ser integrado ao DNA cromossômico para que fique estável^{21,26}.

Algumas bactérias são constitutivamente competentes, como é o caso de *Streptococcus pneumoniae*. Outras espécies bacterianas capazes de transformação natural podem desenvolver competência sob certas condições, tais como a presença de peptídeos ou autoindutores, o estado nutricional ou outras condições estressantes. A exposição a antimicrobianos também pode induzir competência em muitas espécies de bactérias estimulando a transformação^{22,23}.

2.2.3 Transdução

O mecanismo de transdução compreende a transferência genética com auxílio de bacteriófagos (vírus que infectam bactérias). Existem duas formas de transdução: a generalizada e a especializada. Na transdução generalizada, um fragmento aleatório de DNA da célula hospedeira é inserido na partícula do bacteriófago durante o processo de lise celular. A transdução especializada é mediada por fagos lisogênicos ou temperados. Quando ocorre a excisão do profago (DNA viral incorporado ao DNA bacteriano), este pode carrear um fragmento de DNA bacteriano que estava adjacente. Quando ocorre a infecção em outra bactéria, o DNA viral contendo o fragmento de DNA bacteriano pode ser incorporado ao DNA da bactéria receptora^{22,27}.

A mobilização de genes de resistência através de transdução tem sido descrita para algumas espécies bacterianas como, por exemplo, a transferência de resistência à tetraciclina e gentamicina em *Enterococcus spp*^{22,23}.

2.3 Outras formas de transferência de genes e elementos genéticos móveis

2.3.1 Transposição

A transposição é a transferência de genes dentro de uma mesma célula através de transposons (DNA). Os transposons são sequências de DNA que possuem pelo menos um gene que codifica uma transposase, enzima capaz de reconhecer sequências de DNA repetidas e invertidas (IR) localizadas nas extremidades dos transposons. As transposases excisam os transposons e os

inserir em outro ponto do cromossomo ou plasmídeos. Eles carregam toda a informação genética necessária para sua transposição. A presença desses elementos é um fator importante de alterações no genoma bacteriano, como inversões e deleções, que podem ser causadas pela recombinação homóloga entre transposons. Além disso, podem ocorrer fusões de elementos de DNA diferentes, tais como um plasmídeo e um cromossomo, se transposons similares estiverem presentes em ambos os elementos.

Existem, basicamente, três tipos de elementos transponíveis: sequências de inserção, transposons simples e transposons compostos. Considerando a problemática da resistência antimicrobiana, algumas sequências de inserção podem atuar como promotores da expressão de genes de resistência, como por exemplo, a presença da sequência de inserção *ISAbal* localizada logo a montante dos genes que codificam as carbapenemases OXA-51 e OXA-23, em *Acinetobacter baumannii* resultam em uma hiperexpressão desses genes²⁸.

Os transposons desempenham um papel importante na disseminação dos genes de resistência a antimicrobianos. A disseminação do gene que codifica a carbapenemase KPC, por exemplo, tem sido associada ao transposon Tn4401. Tal transposon, pertence à família dos transposons Tn3, e na maioria das vezes, encontra-se inserido em plasmídeos conjugativos^{22,23}.

2.3.2 Integrons

Integrons são elementos genéticos capazes de integrar ou mobilizar cassetes gênicos por mecanismos de recombinação sítio-específico. Tais elementos estão amplamente distribuídos entre as bactérias Gram-negativas, associados a diferentes elementos móveis, como sequências de inserção, transposons e plasmídeos. Diferentes classes de integrons já foram descritas, sendo os integrons de classe 1 os mais comumente associados à resistência aos antimicrobianos.

A estrutura básica dos integrons é formada pelo gene da integrase (*intI*), que possui atividade de recombinação sítio-específica; uma região reguladora, chamada de região P; e um sítio específico de recombinação *attI*. Adjacente a região *attI* do integron, encontra-se a região variável que pode conter um ou mais cassetes gênicos. Os cassetes gênicos são unidades que contêm um gene, normalmente um gene de resistência a antimicrobianos, e um sítio de recombinação (*attC*) que é reconhecido pela integrase codificada pelo integron. Alguns integrons possuem vários cassetes gênicos inseridos sequencialmente a partir do sítio *attI* conferindo resistência a diferentes classes de antimicrobianos^{23,29,30}.

2.4 Referências bibliográficas

1. Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol*. 2015;13(1):42–51.
2. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum* [Internet]. 2016. Disponível em: <http://www.asmscience.org/content/journal/microbiolspec/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>
3. Fernandez L, Hancock REW. Adaptive and Mutational Resistance: Role of Porins and Efflux Pumps in Drug Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. 2012;25(4):661–81.
4. Pagès J-M, James CE, Winterhalter M. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol*. 2008;6(12):893–903.
5. Chevalier S, Bouffartigues E, Bodilis J, Maillot O, Lesouhaitier O, Feuilloley MGJ, et al. Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins. *FEMS Microbiology Reviews*. 2017;41(5):698–722.
6. Hamzaoui Z, Ocampo-Sosa A, Fernandez Martinez M, Landolsi S, Ferjani S, Maamar E, et al. Role of association of OmpK35 and OmpK36 alteration and *bla*^{ESBL} and/or *bla*_{AmpC} genes in conferring carbapenem resistance among non-carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2018;52(6):898–905.
7. Jacoby GA. AmpC β -Lactamases. *CMR*. 2009;22(1):161–82.
8. Blair JM, Richmond GE, Piddock LJ. Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance. *Future Microbiology*. 2014;9(10):1165–77.
9. Puzari M, Chetia P. RND efflux pump mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*: a major issue worldwide. *World J Microbiol Biotechnol*. 2017;33(2):24.
10. Aguayo-Reyes A, Quezada-Aguiluz M, Mella S, Riedel G, Opazo-Capurro A, Bello-Toledo H, et al. Bases moleculares de la resistencia a metilina en *Staphylococcus aureus*. *Rev chil infectol*. 2018;35(1):7–14.
11. Peacock SJ, Paterson GK. Mechanisms of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annu Rev Biochem*. 2015;84(1):577–601.
12. Olaitan AO, Morand S, Rolain J-M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol*. 2014; 26 (5):643.
13. Bush K. Past and Present Perspectives on β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62(10):e01076-18, /aac/62/10/e01076-18.atom.
14. Bush K, Jacoby GA. Updated Functional Classification of β -Lactamases. *AAC*. 2010;54(3):969–76.

15. The structure of β -lactamases. *Phil Trans R Soc Lond B*. 1980;289(1036):321–31.
16. Bush K, Fisher JF. Epidemiological Expansion, Structural Studies, and Clinical Challenges of New β -Lactamases from Gram-Negative Bacteria. *Annu Rev Microbiol*. 2011;65(1):455–78.
17. Bush K, Bradford PA. Epidemiology of β -Lactamase-Producing Pathogens. *Clin Microbiol Reviews*. 2020;33(2):e00047-19, /cmr/33/2/CMR.00047-19.atom.
18. Philippon A, Jacquier H, Ruppé E, Labia R. Structure-based classification of class A beta-lactamases, an update. *Current Research in Translational Medicine*. 2019;67(4):115–22.
19. Sawa T, Kooguchi K, Moriyama K. Molecular diversity of extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. *J Intensive Care*. 2020;8(1):13.
20. Toleman MA. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2002;50(5):673–9.
21. Soucy SM, Huang J, Gogarten JP. Horizontal gene transfer: building the web of life. *Nat Rev Genet*. 2015;16(8):472–82.
22. von Wintersdorff CJH, Penders J, van Niekerk JM, Mills ND, Majumder S, van Alphen LB, *et al*. Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Front Microbiol*. 2016; 7: 173.
23. Partridge SR, Kwong SM, Firth N, Jensen SO. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Reviews*. 2018;31(4):e00088-17, /cmr/31/4/e00088-17.atom.
24. Sun D. Pull in and Push Out: Mechanisms of Horizontal Gene Transfer in Bacteria. *Front Microbiol*. 2018;9:2154.
25. Harrison E, Brockhurst MA. Plasmid-mediated horizontal gene transfer is a coevolutionary process. *Trends in Microbiology*. 2012;20(6):262–7.
26. Arber W. Horizontal Gene Transfer among Bacteria and Its Role in Biological Evolution. *Life*. 2014;4(2):217–24.
27. Chiang YN, Penadés JR, Chen J. Genetic transduction by phages and chromosomal islands: The new and noncanonical. Kline KA, organizador. *PLoS Pathog*. 2019;15(8):e1007878.
28. Turton JF, Ward ME, Woodford N, Kaufmann ME, Pike R, Livermore DM, *et al*. The role of ISAb₁ in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*: Role of ISAb₁ in expression of OXA carbapenemase genes. *FEMS Microbiology Letters*. 2006;258(1):72–7.

29. Deng Y, Bao X, Ji L, Chen L, Liu J, Miao J, et al. Resistance integrons: class 1, 2 and 3 integrons. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2015;14(1):45.
30. Stalder T, Barraud O, Casellas M, Dagot C, Ploy M-C. Integron Involvement in Environmental Spread of Antibiotic Resistance. *Front Microbio* 2012; 3: 119.

Capítulo 3:

Microrganismos multirresistentes de importância clínica e suas resistências intrínsecas e adquiridas

Adriana Cardenas
Fernanda Esposito
Raquel Regina Bonelli
Jorge Luiz Mello Sampaio
Nilton Lincopan

3.1 Introdução

A distribuição das bactérias é ubiqüitária na natureza, onde fazem parte da microbiota dos diversos hospedeiros e ecossistemas que integram a vida no planeta. A adaptação aos diferentes ambientes que podem colonizar é dependente do mosaico de genes intrínsecos e adquiridos que compõem o genoma bacteriano (cromossomo e plasmídeos), sendo que a recombinação de genes pode acontecer de forma espécie-inespecífica¹.

Em ambientes ou condições que propiciam a competitividade entre as bactérias para seleção/estabelecimento do seu nicho ecológico, algumas espécies se perpetuam graças à produção de metabólitos secundários com atividade antibacteriana (sejam antimicrobianos ou bacteriocinas) que exercem uma pressão seletiva. Portanto, na natureza, fungos e bactérias que produzem compostos antimicrobianos são intrinsecamente resistentes a eles, uma vez que carregam os genes que codificam esse mecanismo de resistência específico¹.

Por outro lado, a versatilidade genética das bactérias permite que muitas espécies incorporem genes de resistência necessários para subsistir em ambientes com alta pressão seletiva. Conseqüentemente, a interação entre espécies clinicamente importantes e bactérias intrinsecamente resistentes, presentes na natureza, tem favorecido os processos de recombinação genética, resultando na emergência e disseminação de patógenos resistentes aos antimicrobianos comercialmente disponíveis¹.

Nos anos 80, a introdução e o uso massivo das cefalosporinas de amplo espectro, estáveis à degradação por β -lactamases TEM-1 e SHV-1, contribuíram para a seleção de isolados que albergavam mutações nos genes bla_{TEM-1} , bla_{TEM-2} e bla_{SHV-1} , as quais deram

origem às novas variantes de β -lactamases, com alterações conformacionais no seu sítio catalítico e expansão do espectro de atividade. Essas variantes passaram a hidrolisar as cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos e, por essa razão, foram denominadas β -lactamases de espectro estendido (“Extended-Spectrum β -lactamase” – ESBLs). Paralelamente, a versatilidade genética dessas espécies também favoreceu a aquisição de genes codificadores de ESBLs, a partir de espécies intrinsecamente resistentes às cefalosporinas como *Kluyvera* spp². De fato, tem sido demonstrado que a origem de variantes de ESBLs do tipo CTX-M, amplamente disseminadas em *K. pneumoniae* e *E. coli*, foi a partir de *Kluyvera ascorbata*, *Kluyvera cryocrescens*, e *Kluyvera georgiana*, onde a mobilização de genes bla_{KLU} (intrínsecos em *Kluyvera* spp. e precursores dos genes bla_{CTX-M}) para plasmídeos, provavelmente foi mediada por elementos genéticos móveis do tipo *ISEcp1*².

Atualmente, o uso massivo de carbapenêmicos e polimixinas tem contribuído para o surgimento de linhagens de *E. coli* e *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases (majoritariamente KPC-2) e resistentes às polimixinas, pela aquisição de mutações ou genes que codificam para a produção de fosfoetanolamina transferases, como *mcr-1*³. A incorporação de genes bla_{CTX-M} e bla_{KPC-2} no cromossomo dessas bactérias tem sido um evento cada vez mais frequente, suportando a teoria de que o fenômeno da resistência intrínseca em bactérias clinicamente significantes pode ser uma característica própria da evolução bacteriana e exposição contínua aos antimicrobianos².

O perfil de resistência apresentado por uma determinada espécie bacteriana tem dado origem a critérios interpretativos de multirresistência (MDR), resistência extrema (XDR) e pan-resistência (PDR). MDR se define quando uma espécie apresenta resistência a antimicrobianos pertencentes a três ou mais diferentes classes (ex., β -lactâmicos, aminoglicosídeos, quinolonas, sulfas, tetraciclinas, dentre outras). Já uma espécie bacteriana extensivamente resistente pode apresentar sensibilidade apenas a antimicrobianos pertencentes, no máximo, a duas classes; enquanto uma espécie bacteriana pan-resistente, pode apresentar resistência a todos os agentes antibacterianos disponíveis, pertencentes às diferentes classes⁴.

Recentemente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) (5) publicou uma lista de “patógenos prioritários” resistentes aos antimicrobianos para pesquisa e desenvolvimento de novos antimicrobianos, na qual se incluem 12 famílias de bactérias que ameaçam a saúde humana (Quadro 1). O grupo de prioridade crítica inclui bactérias multirresistentes que têm importância clínica principalmente em hospitais, casas de repouso, e em pacientes submetidos a processos invasivos, cateterização, e/ou ventilação mecânica. Nesse grupo de patógenos se incluem *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacterales*, tais como *Klebsiella* spp., *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp. e *Morganella* spp. Tais

bactérias podem produzir infecções graves como bacteremia, sepse e pneumonia e estão associadas a elevados índices de morbidade e mortalidade.

Quadro 1. Patógenos prioritários resistentes aos antimicrobianos (OMS, 2017)5.

Prioridade 1: CRÍTICA	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Acinetobacter baumannii</i> resistente aos carbapenêmicos • <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente aos carbapenêmicos • <i>Enterobacterales*</i> resistente aos carbapenêmicos, às cefalosporinas de terceira geração
Prioridade 2: ELEVADA	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Enterococcus faecium</i> resistente à vancomicina • <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina (oxacilina), com sensibilidade intermediária ou resistência à vancomicina • <i>Helicobacter pylori</i> resistente à claritromicina • <i>Campylobacter</i> spp. resistente às fluoroquinolonas • <i>Salmonella</i> spp. resistente às fluoroquinolonas • <i>Neisseria gonorrhoeae</i> resistente às cefalosporinas e às fluoroquinolonas
Prioridade 3: MÉDIA	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Streptococcus pneumoniae</i> não sensível à penicilina • <i>Haemophilus influenzae</i>, resistente à ampicilina • <i>Shigella</i> spp. resistente às fluoroquinolonas

* *Klebsiella* spp., *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp. e *Morganella* spp.

3.2 Resistência intrínseca

Para algumas espécies bacterianas, a resistência intrínseca é uma característica natural mediada pela presença de um gene específico que confere a expressão do mecanismo de resistência, ou decorrente da composição estrutural, ou metabolismo da bactéria (Tabela 1 e Tabela 2). De fato, nas bactérias Gram-negativas, a própria membrana externa, aniônica e de alta hidrofobicidade, pode ser uma barreira física para alguns antimicrobianos que possuem uma estrutura físico-química de natureza aniônica ou altamente hidrofílica. Por outro lado, alguns antimicrobianos, como as polimixinas catiônicas (colistina e polimixina B), se ligam por interação eletrostática a seu alvo, a membrana externa (lipídeo A) presente em bactérias Gram-negativas. Portanto, bactérias Gram-positivas são intrinsecamente resistentes às polimixinas. Da mesma forma, pelo tipo de estrutura química, bactérias Gram-negativas são intrinsecamente resistentes aos glicopeptídeos (vancomicina e teicoplanina), já que são moléculas excessivamente grandes para penetrarem a membrana externa⁶.

Bactérias anaeróbias estritas apresentam resistência intrínseca aos aminoglicosídeos devido ao fato de que esses antimicrobianos requerem transporte ativo de elétrons para serem captados pelas células, portanto, em condições anaeróbias estritas, as moléculas de aminoglicosídeo podem não ser absorvidas pela bactéria⁶.

O conhecimento da resistência intrínseca apresentada por algumas espécies bacterianas pode ser utilizado para confirmar a identificação prévia de uma espécie, assim como pode ser a base para a preparação de meios de culturas seletivos.

Tabela 1. Resistências intrínsecas em bactérias Gram-negativas de importância clínica (adaptado do documento do EUCAST)⁷

Bactéria	Resistências intrínsecas
Complexo <i>Acinetobacter baumannii</i> / <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Ampicilina, amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, aztreonam, cefalosporinas 1ª geração, ertapenem, trimetoprima, cloranfenicol, fosfomicina
<i>Aeromonas</i> spp.	Ampicilina, amoxicilina
<i>Bacteroides</i> spp.	Penicilina, ampicilina, aminoglicosídeos
Complexo <i>Burkholderia cepacia</i>	Ampicilina, amoxicilina, ticarcilina, piperacilina, amoxicilina/ácido clavulânico, ampicilina/sulbactam, cefalosporinas 1ª geração, ertapenem, colistina, polimixina B, aminoglicosídeos, fosfomicina
<i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Campylobacter coli</i>	Trimetoprima
<i>Citrobacter freundii</i>	Ampicilina, amoxicilina, amoxicilina/clavulânico, ampicilina/sulbactam, cefalosporinas 1ª geração, cefuroxima, cefoxitina
<i>Citrobacter koseri</i> , <i>Citrobacter diversus</i> <i>Citrobacter amalonaticus</i> (grupo)	Ampicilina, amoxicilina, ticarcilina
<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	Todos os β-lactâmicos com exceção da piperacilina/tazobactam
<i>Enterobacterales</i>	Penicilina G, glicopeptídeos, macrolídeos, clindamicina, linezolida, estreptograminas (quinupristina/dalfopristina), mupirocina
<i>Enterobacter</i> spp.	Ampicilina, amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, cefalosporinas 1ª geração, cefoxitina
<i>Haemophilus influenzae</i>	Penicilina G, eritromicina, clindamicina
<i>Hafnia alvei</i>	Ampicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, ampicilina/sulbactam, cefalosporinas 1ª geração, cefamicinas (cefoxitina)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>K. variicola</i> , <i>K. oxytoca</i>	Ampicilina, amoxicilina, carbenicilina, ticarcilina
<i>Klebsiella aerogenes</i>	Ampicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, ampicilina/sulbactam, cefalosporinas 1ª geração, cefamicinas (cefoxitina)
<i>Moraxella catarrhalis</i>	Trimetoprima, lincosamidas, cefalosporinas 1ª e 2ª gerações
<i>Morganella morganii</i>	Ampicilina, amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, cefalosporinas 1ª geração, cefuroxima, colistina, polimixina B, nitrofurantoína, tetraciclina, tigeciclina
<i>Neisseria</i> spp.	Lincosamidas, colistina, polimixina B
<i>Providencia</i> spp.	Ampicilina, amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, cefalosporinas 1ª geração, gentamicina, netilmicina, tobramicina, colistina, polimixina B, nitrofurantoína, tetraciclina, tigeciclina
<i>Proteus mirabilis</i>	Colistina, polimixina B, nitrofurantoína, tetraciclina, tigeciclina
<i>Proteus vulgaris</i>	Ampicilina, amoxicilina, cefalosporinas 1ª geração, cefuroxima, colistina, polimixina B, nitrofurantoína, tetraciclina
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ampicilina, amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, ampicilina/sulbactam, cefalosporinas 1ª e 2ª gerações, cefotaxima, ceftriaxona, ertapenem, ácido nalidíxico, nitrofurantoína, trimetoprima, tetraciclina (tigeciclina)
<i>Raoultella</i> spp.	Ampicilina, ticarcilina
<i>Salmonella</i> spp.	Cefuroxima e aminoglicosídeos (ativo <i>in vitro</i> , mas não ativo <i>in vivo</i>)
<i>Serratia</i> spp.	Ampicilina, amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, ampicilina/sulbactam, cefalosporinas 1ª geração, cefuroxima, cefoxitina, colistina
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Todos os β-lactâmicos, aminoglicosídeos, trimetoprima, fosfomicina
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Ampicilina, amoxicilina, carbenicilina, ticarcilina, cefalosporinas 1ª geração

Tabela 2. Resistências intrínsecas em bactérias Gram-positivas de importância clínica (adaptado de EUCAST)⁷

Bactéria	Resistência intrínseca
Todas as Gram-positivas	Aztreonam, colistina, ácido nalidíxico
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Ácido fusídico, ceftazidima e fosfomicina
<i>Streptococcus</i> spp.	Aminoglicosídeos*, ceftazidima
<i>Enterococcus faecium</i>	Carbenicilina, ticarcilina, oxacilina, todas as cefalosporinas aminoglicosídeos*, macrolídeos, mupirocina, clindamicina, trimetoprima, sulfametoxazol
<i>Enterococcus faecalis</i>	Carbenicilina, ticarcilina, oxacilina, todas as cefalosporinas aminoglicosídeos*, macrolídeos mupirocina, clindamicina, trimetoprima, sulfametoxazol, estreptograminas (quinupristina/dalfopristina)
<i>Enterococcus gallinarum</i> <i>E. casseliflavus</i>	Vancomicina, carbenicilina, ticarcilina, oxacilina, todas as cefalosporinas, aminoglicosídeos*, mupirocina, clindamicina, trimetoprima, sulfametoxazol, estreptograminas (quinupristina/dalfopristina)
<i>Listeria monocytogenes</i>	Cefalosporinas de 3ª geração, fluoroquinolonas
<i>Clostridium</i> spp. <i>Clostridioides difficile</i>	Aminoglicosídeos

*Baixo grau de resistência. Combinações de aminoglicosídeos com inibidores da parede celular (penicilinas e glicopeptídeos) são sinérgicas e bactericidas contra isolados que são sensíveis aos inibidores da parede celular e não apresentam alto grau de resistência aos aminoglicosídeos

3.3 Resistência adquirida

3.3.1 *Staphylococcus* spp.

Bactérias do gênero *Staphylococcus* compõem a microbiota de seres humanos e animais, habitando pele e mucosas. São patógenos oportunistas e estão associados a infecções brandas, tais como infecções de pele e intoxicações alimentares, mas também podem causar infecções graves, potencialmente fatais, como pneumonias, bacteremias e infecções relacionadas a dispositivos médicos invasivos. Dentre as espécies, *Staphylococcus aureus* é a mais patogênica por possuir uma diversidade de fatores de virulência⁸.

Em *Staphylococcus* spp., o mecanismo de resistência mais importante para os β -lactâmicos está relacionado com a resistência a oxacilina/meticilina mediada pelo gene *mecA*, o que se traduz em resistência a todos os β -lactâmicos, com exceção das novas cefalosporinas ceftobiprole e ceftarolina (Tabela 3). O gene *mecA* codifica uma proteína ligadora de penicilina (“Penicillin-binding Protein” – PBP) alterada, a PBP2a, que apresenta baixa afinidade pelos β -lactâmicos, mas que preserva sua atividade de transpeptidase. Assim, é possível manter a síntese adequada da parede celular de *Staphylococcus* spp., mesmo na presença de β -lactâmicos^{8,9}.

Os pontos de corte para interpretar essa resistência, assim como os métodos de avaliação, variam segundo a espécie: *S. aureus*, *Staphylococcus pseudintermedius* (de importância em medicina veterinária) e *Staphylococcus schleiferi*, *Staphylococcus epidermidis* ou as demais espécies coagulase negativa^{7,10}.

Para macrolídeos, lincosamidas e estreptogramina B (MLS_B), o mecanismo de resistência mais prevalente é a produção de metilases mediadas por genes *erm*. Para fluoroquinolonas, mutações pontuais em topoisomerasas, e a expressão de bombas de efluxo como NorA, são os principais mecanismos de resistência⁹.

Para glicopeptídeos (vancomicina, teicoplanina) têm sido descritas cepas de *S. aureus* com sensibilidade intermediária (*Glycopeptide-Intermediate Staphylococcus aureus* – GISA), expressa de forma homogênea ou heterogênea, através de um complexo mecanismo que envolve o espessamento da parede celular bacteriana e a produção de terminais D-alanil-D-alanina (D-Ala-D-Ala) livres. O alto grau de resistência aos glicopeptídeos (“Glycopeptide-Resistant *Staphylococcus aureus*” – GRSA ou “Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*” – VRSA) relaciona-se à síntese de precursores de peptidoglicano contendo o D-Ala-D-Lac, ao invés da composição constitutiva D-Ala-D-Ala. Essa substituição do aminoácido alanina por lactato é codificada pelo gene *vanA*, localizado em transposons presentes em plasmídeos conjugativos⁹.

Para oxazolidinonas, tais como a linezolida, a resistência está associada a mutações nos genes que codificam porções específicas no RNAr, alterações nesse sítio causadas por genes plasmidiais ou, mais recentemente, pela presença de proteínas da família ARE ABC-F (*poxtA*)¹¹.

Tabela 3. Fenótipos e mecanismos de resistência em *Staphylococcus* spp.^{9,11}

Antimicrobiano						Mecanismo de resistência	Incidência
β-lactâmicos							
PEN	OXA	AMP	AMC	CFO			
S	S	S	S	S		Sensível	Baixa
R	S	R	S	S		Penicilinase	Muito alta
R ¹	R ¹	R ¹	R ¹	R ¹		PBP2a (<i>mecA</i>)	Alta
Macrolídeos-Lincosamidas-EstreptoGraminas (MLS)							
ERI	AZI	SPI	CLD	STG _B	STG _A		
S	S	S	S	S	S	Sensível	Alta
R	R	R	R	R	S	Metilase RNAr 23S (<i>ermA</i> , <i>ermC</i>): cMLS _B	Moderada
R	R	S/R	S/R	S/R	S	Metilase RNAr 23S (<i>ermA</i> , <i>ermC</i> , <i>ermY</i>): iMLS _B ²	Baixa
I/R	I/R	S	S	S/R	S	Bomba de efluxo (<i>msrA</i> , <i>msrB</i> , <i>mphC</i> , <i>erpA</i>): M, MS	Baixa
S	S	S	S/I/R	S	S	Inativação (<i>inuA</i> , <i>inuB</i> , <i>inuC</i>)	Muito baixa
S	S	S	S/I/R	S	I/R	Modificação do alvo (<i>cfi</i>) ³	Muito baixa
S	S	S	S	S	R	Inativação (<i>vatA</i> , <i>vatB</i> , <i>vatC</i>) Bomba de efluxo (<i>vgaA</i> , <i>vgaB</i>)	Muito baixa
S	S	S	S	R	S	Inativação (<i>vgbA</i> , <i>vgbB</i>)	Muito baixa
Oxazolidinonas							
LZD							
R						Mutações em L3 e RNAr 23S	Muito baixa
R						Alteração no sítio de ação (<i>cfi</i>)	Muito baixa
R						Proteína da família ARE ABC-F (<i>poxtA</i>)	Muito baixa
Aminoglicosídeos*							
STR	GEN	TOB	AMI	CAN	NET		
S	S	S	S	S	S	Sensível	Alta
S	R	R	R	R	R	Inativação enzimática [AAC(6'), APH(2'')]	Moderada (alta em MRSA)
S	S	S	S/R	R	S	Inativação enzimática [APH(3')-III]	Baixa
R	S	S	S	S	S	Inativação enzimática [ANT(6)]	Baixa
R	S	S	S/R	R	S	Inativação enzimática [ANT(6) + APH(3')-III]	Baixa
Glicopeptídeos Lipopeptídeos							
VAN	TEI	DAP					
S	S	S				Sensível	Alta
I/R	I/R	S				<i>vanA</i>	Muito baixa
R	R	R				Mutações em <i>mprF</i> e <i>walK</i> , e no operon <i>dltABCD</i> (mudança de carga e repulsão eletrostática)	Muito baixa
Tetraciclina							
TET	DOX						
R	R					Bomba de efluxo (<i>tetK</i> , <i>tetL</i>) Proteína de proteção ribossomal (<i>tetM</i> , <i>tetO</i>)	Baixa/ Moderada

AMC, amoxicilina/ácido clavulânico; AMI, amikacina; AMP, ampicilina; AZI, azitromicina; CLD, clindamicina; DAP, daptomicina; DOX, doxiciclina; ERI, eritromicina; CFO, cefoxitina; GEN, gentamicina; CAN, kanamicina; LZD, linezolidina; NET, netilmicina; OXA, oxacilina; PEN, penicilina; SPI, espiramicina; STG_A, estreptogramina grupo A (dalfonopristina); STG_B, estreptogramina grupo B (quinopristina); STR, estreptomicina; TEI, teicoplanina; TET, tetraciclina; TOB, tobramicina; VAN, vancomicina.

¹Cepas de estafilococos resistentes à oxacilina ou ceftoxitina devem ser consideradas resistentes para todos os β-lactâmicos, com exceção ao ceftobiprol e ceftarolina.

²Em cepas com fenótipo MLS_B induzível (iMLS_B) a eritromicina induz o mecanismo de resistência conferindo resistência a todos os antimicrobianos MLS_B.

³A expressão do gene *cfi* confere resistência aos fenicóis, lincosamidas, oxazolidinonas, pleuromutilinas (tiamulina e valnemulina) e estreptogramina A.

⁴Há uma diversidade grande de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos. A tabela apresenta apenas alguns exemplos.

3.3.2 *Enterococcus* spp.

Enterococcus spp. fazem parte da microbiota intestinal de animais e seres humanos, bem como do ambiente. As duas espécies mais importantes, *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis*, são frequentemente associadas a diferentes infecções em animais e seres humanos imunocomprometidos, tais como endocardites, bacteremia, sepse, infecções do trato urinário, infecção de sítio cirúrgico e, mais raramente, meningites. Outras espécies como *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus avium*, *Enterococcus casseliflavus* e *Enterococcus durans* são clinicamente de menor importância¹².

Em *Enterococcus* spp. o principal mecanismo de resistência aos β -lactâmicos está relacionado a mutações nos genes que codificam PBPs, especificamente do tipo PBP5, que têm baixa afinidade pelos antimicrobianos desta classe (Tabela 4). Como consequência dessas mutações, todos os *Enterococcus* spp. apresentam resistência de alto nível às penicilinas semissintéticas e à maioria das cefalosporinas^{13,14}. Adicionalmente, alguns isolados de *Enterococcus* spp. também podem produzir uma β -lactamase idêntica à β -lactamase estafilocócica, porém, devido ao baixo nível de produção, ela não pode ser detectada por testes de sensibilidade de rotina, como métodos de diluição ou difusão. Para sua detecção, em casos de suspeita, é possível utilizar: i) discos de nitrocefina; ou ii) discos de ampicilina e ampicilina-sulbactam, onde o teste é interpretado como positivo quando há um aumento de ≥ 4 mm no halo de inibição de ampicilina-sulbactam^{7,10}.

No caso de macrolídeos, lincosamidas e estreptogramina B (MLS_B), dentre os mecanismos de resistência mais prevalentes estão a expressão de metilases mediadas por genes *erm*, e expressão de bombas de efluxo mediadas pelo gene *lsa*. Para fluoroquinolonas, mutações pontuais nos genes *parC* e *gyrA* resultam em alterações no sítio alvo de topoisomerasas. Por outro lado, a expressão de bombas de efluxo, mediadas pelo gene *norA*, também pode contribuir para a resistência a este tipo de antibacterianos¹⁴.

Para oxazolidinonas (linezolida), a aquisição do gene *cfr* e mutações no domínio V da subunidade 23S do ribossomo são apontados como principais mecanismos de resistência¹¹. No caso dos lipopeptídeos (daptomicina), os principais mecanismos de resistência são associados a mutações nos genes *liaF*, *gdpD* e *cls*, que estão relacionadas ao reparo do dano causado pelo lipopeptídeo na célula bacteriana¹⁵. Novos genes de resistência, mediados por plasmídeo, o *optrA* e *poxtA*, foram identificados em isolados de *E. faecalis* e *E. faecium* resistentes à linezolida e à tedizolida. Eles codificam um transportador ABC que confere resistência a oxazolidinonas e fenicóis. Além disso, *poxtA* caracteriza sensibilidade diminuída às tetraciclinas^{16,17}.

Tabela 4. Fenótipos e mecanismos de resistência aos antimicrobianos em *Enterococcus* spp.¹²⁻¹⁹

Antimicrobianos						Mecanismo de Resistência	Incidência
β-lactâmicos							
PEN	AMP	AMC	IMP				
S	S	S	S			Sensível	Alta (<i>E. faecalis</i>) Moderada (<i>E. faecium</i>)
R	R	R	R			Alteração ou superprodução de PBP5	Muito baixa (<i>E. faecalis</i>) Alta (<i>E. faecium</i>)
R	R	S ^a	S			β-lactamase	Muito baixa
Macrolídeos-Lincosamidas-Estreptograminas (MLSs)							
ERI	AZI	SPI	CLD	STG _A	STG _B		
S	S	S	S (R)	S	S	Sensível	Moderada/baixa
R	R	R	R	S	R	Metilase RNAr 23S (<i>ermB</i>): MLS _B	Alta
R	R	R	R	R	R	Metilase RNAr 23S (<i>ermB</i>): MLS _{A/B} + inativação enzimática (<i>vatD</i> e <i>vatE</i>)	Baixa (<i>E. faecium</i>) ^p
I/R	I/R	S	S	S	S	Bomba de efluxo (<i>mef</i>)	Muito baixa
Aminoglicosídeos							
STR	GEN	TOB	AMI	CAN	NET		
S	S	S	S	S	S	Sensível	Alta
R	S	S	S	S	S	Inativação enzimática [ANT(6), ANT(3'')] ou mutação ribossomal	Alta
S	S	S	S/R	R	S	Inativação enzimática [APH(3')-III]	Moderada
R	S	S	S/R	R	S	Inativação enzimática [ANT(6') + APH(3')-III]	Moderada
S	R	R	S/R	R	R	Inativação enzimática [AAC(6'), APH(2'')]	Alta/moderada
S	S	R	S	R	R	Inativação enzimática [AAC(6')-Ii e variantes]	Intrínseca em <i>E. faecium</i> , <i>E. durans</i> , <i>E. hirae</i> ^c
S	R	R	S	R	R	Inativação enzimática [APH(2'')-Ib, APH(2'')-Id, APH(2'')-Ie]	Muito baixa
S	R	R	S	R	S	Inativação enzimática [APH(2'')-Ic]	Muito baixa
Glicopeptídeos							
VAN	TEI						
S	S					Sensível	Alta
R	R					<i>vanA</i>	Moderada (todas as espécies)
I/R	S					<i>vanB</i> ^d	Baixa (<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. durans</i> , <i>E. gallinarum</i>)
I/R	S					<i>vanD</i> , <i>vanE</i> , <i>vanG</i> , <i>vanL</i>	Muito baixa (<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i>)
R	S					<i>vanM</i>	Muito baixa (<i>E. faecium</i>)
S/I/R	S					<i>vanC</i> -1 ^e	Intrínseco em <i>E. gallinarum</i>
S/I/R	S					<i>vanC</i> -2 ^e	Intrínseco <i>E. casseliflavus</i>
S/I/R	S					<i>vanC</i> -3 ^e	Intrínseco <i>E. flavescens</i>
Lipopeptídeos							
DAP							

Antimicrobianos					Mecanismo de Resistência	Incidência
S					Sensível	Alta
R					Alteração de carga e repulsão de DAP [mutações em <i>yvcRS</i> , <i>oatA</i> , <i>liaFSR</i> e/ou gene <i>cls</i> (cardiolipina sintetase)]	Muito baixa
Oxazolidinonas						
LNZ						
S					Sensível	Alta
R					Metiltransferase (<i>cf</i>) e/ou mutações no RNAr 23S Proteína da família ARE ABC-F (<i>poxtA</i> e <i>optrA</i>)	Muito baixa
R						Muito baixa

AMC, amoxicilina/ácido clavulânico; AMI, amikacina; AMP, ampicilina; AZI, azitromicina; CLD, clindamicina; DAP, daptomicina; ERI, eritromicina; GEN, gentamicina; IMP: imipenem; CAN, canamicina; LNZ, linezolida; NET, netilmicina; PEN, penicilina; SPI, espiramicina; STGA, estreptogramina grupo A; STGB, estreptogramina grupo B; STR, estreptomicina; TEI, teicoplanina; TOB, tobramicina; VAN, vancomicina.

^aA confirmação deste fenótipo requer a detecção de β-lactamase utilizando nitrocefina.

^b*E. faecalis* é intrinsecamente resistente às estreptograminas (quinupristina/dalfopristina).

^cVariantes do gene *aac(6)-II* tem sido identificados em *E. faecium*, *E. hirae* e *E. durans*.

^dCepas com fenótipo VanB são sensíveis à teicoplanina, mas o uso de teicoplanina para tratamento de infecções associadas não é recomendado.

^ePara cepas com Concentração Inibitória Mínima (CIM) baixas para vancomicina, a detecção do gene *vanC* é recomendável, assim como o teste de motilidade (positiva para as espécies *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* e *E. flavescens*).

O fenótipo de resistência de maior importância clínica entre os *Enterococcus* spp. é a resistência aos glicopeptídeos, especialmente à vancomicina (“Vancomycin-Resistant *Enterococci*” – VRE). Essa resistência, conforme descrito para VRSA, está associada à alteração na biossíntese dos precursores de peptideoglicano, mediada pelos genes *van*, especialmente *vanA* e *vanB*, conforme detalhado no Quadro 2. Esse quadro apresenta os fenótipos mais comuns de resistência à vancomicina, VanA, VanB, VanC, VanD e VanE, e suas características genéticas. Além desses, existem outros fenótipos menos comuns, associados aos genes *vanG*, *vanH*, *vanL*, *vanM*, *vanN*. Dependendo do gene associado, haverá a substituição de D-Ala-D-Ala por D-Ala-D-Lac ou D-Ala-D-Ser na formação do peptidoglicano^{18,19}. Os dipeptídeos terminados em lactato ou serina têm baixa afinidade pela vancomicina, impedindo sua ligação ao sítio-alvo, levando à resistência.

Quadro 2. Fenótipos e genótipos de resistência aos glicopeptídeos mais comuns em *Enterococcus* spp.^{12,14,18}

Espécie envolvida	Fenótipo (µg/mL)		Genótipo	Expressão
	Vancomicina	Teicoplanina		
<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i>	64	16	<i>vanA</i>	Induzível (plasmidial)
<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i>	4	0,5 – 1	<i>vanB</i>	Induzível (plasmidial)
<i>E. gallinarum</i>	2 – 32	0,5 – 1	<i>vanC1</i>	Constitutiva
<i>E. casseliflavus</i>	4 – 16	0,5 – 1	<i>vanC2</i>	Constitutiva
<i>E. gallinarum</i>	4 – 16	0,5 – 1	<i>vanC3</i>	Constitutiva
<i>E. faecalis</i>	64 – 128	4 – 8	<i>vanD</i>	Não determinado
<i>E. faecium</i>	16	0,5 – 1	<i>vanE</i>	Não determinado

3.3.3 *Streptococcus* spp.

Dentre todas as espécies do gênero *Streptococcus*, as de maior importância clínica são *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus agalactiae*. Enquanto os estreptococos β -hemolíticos, *S. pyogenes* e *S. agalactiae* apresentam virtualmente 100% de sensibilidade aos β -lactâmicos, a resistência (plena ou intermediária) às penicilinas em *Streptococcus pneumoniae* ocorre em frequência variável e representa um desafio no tratamento das infecções por esse patógeno. O principal mecanismo de resistência aos β -lactâmicos está relacionado a mutações nos genes codificadores de PBPs, associados com a expressão do gene *murM* (Tabela 5). O nível de resistência pode variar de acordo com o tipo de mutação presente em cada isolado; entretanto, um único isolado pode apresentar diferentes mutações nos genes codificadores das PBPs, gerando genes mosaico, resultando em uma diminuição das opções terapêuticas. No gênero, ainda não existem relatos de resistência às cefalosporinas de quinta geração (ceftobiprol e ceftarolina)²⁰.

No caso dos macrolídeos, lincosamidas e estreptogramina B (MLS_B), os principais mecanismos de resistência estão relacionados com a expressão de metilases mediadas por genes *erm*; e expressão de bombas de efluxo codificadas por genes *mef* (Tabela 5)²⁰.

Para fluoroquinolonas, mutações pontuais nos genes codificadores de topoisomerase, principalmente em *parC* e *gyrA*, são comuns. Já para glicopeptídeos, o principal mecanismo de resistência está relacionado à uma mutação que leva à perda da função do gene *vncS*, um gene codificador de histidina-quinase²⁰.

Tabela 5. Fenótipos e mecanismos de resistência aos antimicrobianos em *Streptococcus pneumoniae*²⁰

Antimicrobianos					Mecanismo de Resistência	Incidência
β-lactâmicos Concentração Inibitória Mínima – CIM (μg/mL) e disco-difusão						
PEN	CTX	OXA (disco 1 μg, mm)				
≤0,06	S	<0,5	S	>20	Sensível	Alta
0,12–1	I	<0,5	S	<19	Alterações PBP 1a, 2x, 2b e MurM	Moderada/Alta
≥2	R	<0,5	S	<19		Baixa
≥2	R	1/>2	I/R	<19		Baixa
0,12–0,5	I	>4	R	<19	Alterações PBP 1a, 2x (Thr550Ala), 2b e MurM	Muito baixa
Macrolídeos-Lincosamidas-Estreptograminas						
ERI	AZI	SPI	CLD	STR _B		
S	S	S	S	S	Sensível	Alta
R	R	R	R	R	Metilase rRNA 23S (<i>ermB</i>): cMLS _B	Moderada
R	R	S/R	S/R	R/S	Metilase rRNA 23S (<i>ermB</i>): iMLS _B a	Baixa
R	R	S/R	S/R	R/S	Metilase rRNA 23S (<i>ermA</i>): iMLS _B , cMLS _B	Muito baixa
I/R	I/R	S	S	S	Bombas de efluxo (<i>mefE</i>)	Baixa

AZI, azitromicina; CLD: clindamicina; CTX, cefotaxima; ERI, eritromicina; OXA, oxacilina; PEN, penicilina; SPI, espiramicina; STGA, estreptogramina grupo A; STGB, estreptogramina grupo B.

^aEm cepas com fenótipo MLS_B induzível (iMLS_B) a eritromicina induz resistência a todos os antimicrobianos do grupo MLS_B.

3.3.4 *Enterobacterales*

A ordem *Enterobacterales* engloba bacilos Gram-negativos pertencentes às famílias *Enterobacteriaceae*, *Morganellaceae*, *Yersiniaceae*, dentre outras. Essa ordem é um grupo heterogêneo de bacilos Gram-negativos que têm grande relevância clínica, estando associados a uma diversidade de infecções relacionadas aos cuidados com a saúde ou comunitárias. Tais bactérias podem apresentar fenótipos de multirresistência aos antimicrobianos, associados a diversos mecanismos de resistência²¹.

O principal mecanismo de resistência aos β-lactâmicos e aminoglicosídeos entre *Enterobacterales* é a produção de enzimas específicas que têm a capacidade de alterar a estrutura do antimicrobiano, resultando em sua inativação. Para β-lactâmicos, a alteração química é resultante de um processo de hidrólise do anel β-lactâmico mediado por β-lactamases, secretadas no espaço periplásmico. Para aminoglicosídeos, a modificação química é mediada por transferases que catalisam a O-acetilação, N-acetilação, O-fosforilação, O-nucleotidilação ou O-glicosilação de resíduos que compõem a estrutura do antimicrobiano⁶.

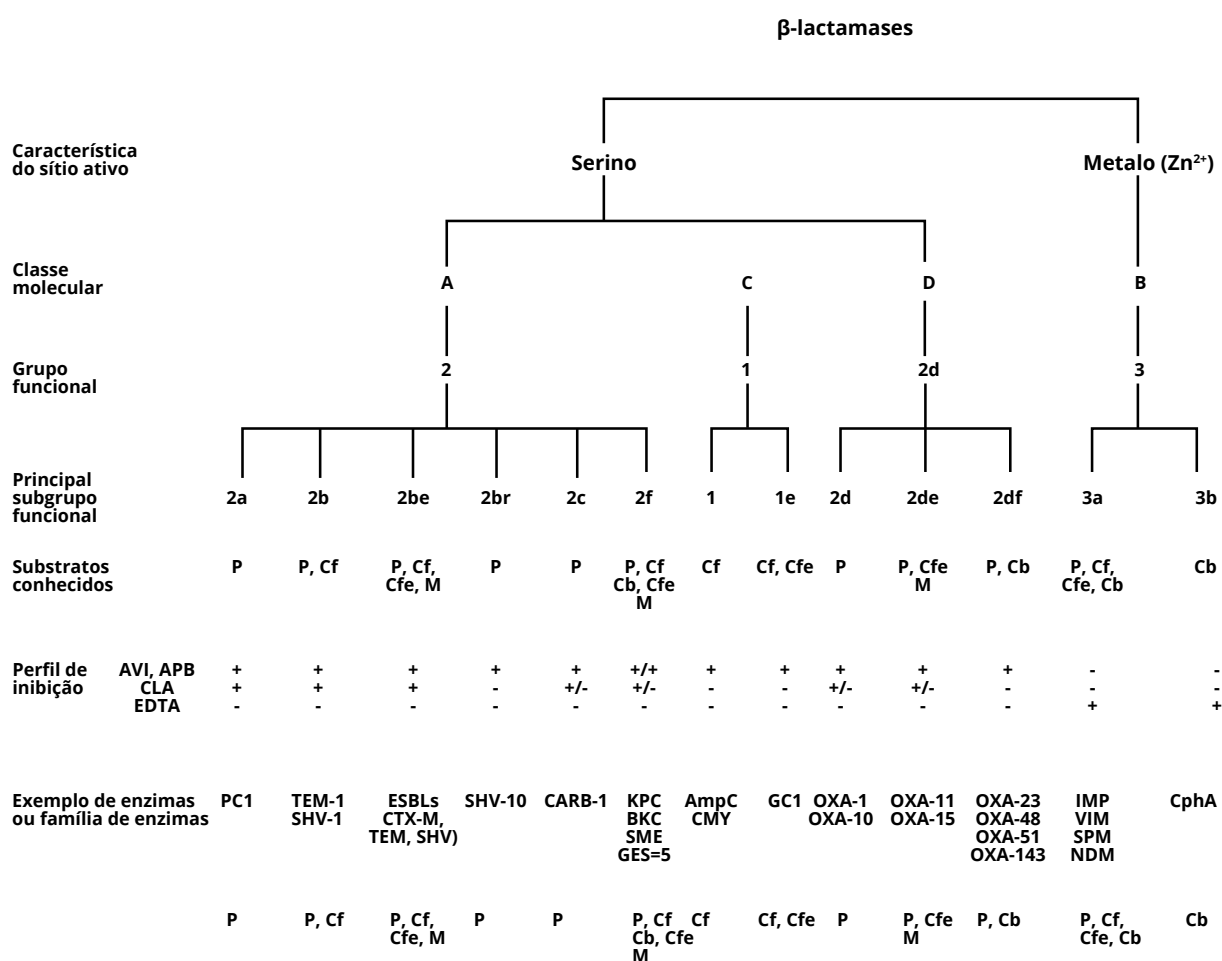
Por outro lado, a resistência às fluoroquinolonas e polimixinas está relacionada principalmente a mutações pontuais no cromossomo, sendo frequentemente decorrentes da pressão seletiva devido à administração incorreta do antimicrobiano. Adicionalmente, a aquisição de genes carregados por plas-

mídeos tem conferido a capacidade de produzir enzimas modificadoras do alvo (ribossomo), ou proteínas alostéricas que protegem o sítio de ligação das topoisomerases⁶.

⇒ **β -lactâmicos e β -lactamases**

Os β -lactâmicos constituem um dos grupos de antimicrobianos mais utilizados na clínica, sendo composto por 4 subclasses: i) penicilinas; ii) cefalosporinas; iii) monobactâmicos; e iv) carbapenêmicos. Essa classe de antimicrobianos possui ação bactericida, já que inibem a síntese do peptideoglicano, causando instabilidade de membrana e consequente morte celular⁶.

Em bactérias Gram-negativas, o principal mecanismo de resistência aos β -lactâmicos é a produção de β -lactamases classificadas de acordo com as características moleculares, sendo subdivididas em: i) classificação simples, ii) classificação baseada na similaridade na sequência de aminoácidos, iii) classe molecular, que é composta por quatro grupos (A, B, C e D), apresentando diferentes níveis evolutivos; iv) estrutura molecular; v) sequência de nucleotídeos; e vi) de acordo com as características funcionais baseadas no perfil de substrato, susceptibilidade a inibidores, características físicas como ponto isoelétrico, e peso molecular (Figura 1)²².



CLA, ácido clavulânico; AVI, avibactam; APB, ácido fenilborônico; EDTA, ácido etilenodiamino tetra-acético. Antimicrobianos: Cb, carbapenêmico; Cf, cefalosporina; Cfe, cefalosporina de espectro estendido; M, monobactâmico; P, penicilina. Adaptado de Bush, 2013²³.

Figura 1. Classificação molecular e funcional de β-lactamases.

Produção de β-lactamases de espectro limitado ou reduzido

A produção de β-lactamases da classe A, denominadas β-lactamases clássicas (ex.: TEM-1, TEM-2 e SHV-1), confere resistência a aminopenicilinas e carboxipenicilinas (carbenicilina e ticarcilina), e sensibilidade diminuída ou intermediária às ureidopenicilinas (piperacilina). As cepas que apresentam apenas esse mecanismo de resistência mantêm sua sensibilidade às cefalosporinas, monobactâmico e carbapenêmicos, porém, a hiperprodução dessas enzimas confere resistência a cefalosporinas de primeira e segunda gerações, exceto cefamicinas como a cefoxitina. Além disso, uma diminuição da sensibilidade à associação de amoxicilina-ácido clavulânico também pode ser observada²².

Produção de β -lactamase de espectro estendido (ESBL)

As primeiras enzimas do tipo ESBLs descritas foram variantes das β -lactamases clássicas mencionadas anteriormente. No entanto, outras famílias de ESBL surgiram, como CTX-M, cuja origem é relacionada a genes presentes no cromossomo de espécies como *Kluyvera ascorbata*, *Kluyvera cryocrescens*, ou *Kluyvera georgiana*². Curiosamente, essa nova família de ESBLs tem sido rapidamente disseminada em diferentes espécies, por todo o mundo, sendo identificadas em isolados provenientes de animais silvestres, de companhia e de produção, de ambientes aquáticos, de alimentos e de humanos^{24,25}.

ESBLs são capazes de inativar todas as cefalosporinas, com exceção das cefamicinas; sendo assim, isolados que apresentam apenas esse mecanismo de resistência mantêm a sensibilidade a: i) associação de β -lactâmicos com inibidores de β -lactamases, como por exemplo, amoxicilina-ácido clavulânico; ii) cefamicinas; e iii) carbapenêmicos^{22,23}.

É importante frisar que a maioria das ESBLs são relativamente fáceis de detectar. Entretanto, a visualização do fenótipo pode ser comprometida caso haja presença de outro mecanismo de resistência, como uma β -lactamase clássica, que pode conferir resistência a β -lactâmicos com inibidores de β -lactamases, ou a produção de carbapenemases. Há também uma maior dificuldade na detecção de ESBLs em *Enterobacterales* que produzem uma β -lactamase cromossômica induzível, a AmpC (ex.: *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Providencia* spp., *Hafnia alvei*, e *Morganella morganii*)^{22,23}.

Produção de carbapenemases

As carbapenemases são β -lactamases com maior capacidade hidrolítica, sendo capazes de inativar praticamente todos os β -lactâmicos disponíveis no mercado, com algumas exceções que incluem a enzima SME (*Serratia marcescens* enzima) e oxa-carbapenemases de *Acinetobacter* spp. A incidência dessas enzimas em *Enterobacterales* é muito alta, sendo mundialmente disseminadas^{22,26}.

Atualmente, o grupo de carbapenemases é composto por três diferentes classes enzimáticas: i) classe A, que são classificadas como serino- β -lactamases, como por exemplo, a *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), que é capaz de inativar os carbapenêmicos ertapenem e imipenem, apresentando menor atividade hidrolítica contra meropenem; ii) classe B, classificadas também como metalo- β -lactamases (MBL), por exemplo *New Delhi* metalo- β -

-lactamase (NDM), Verona *imipenemase* (VIM) e *imipenemase* (IMP), que são capazes de hidrolisar todos os carbapenêmicos, mas não possuem atividade contra monobactâmico (aztreonam); e iii) classe D, que também faz parte do grupo de serino- β -lactamases, como por exemplo as oxacilinas OXA-23, OXA-48, OXA-143, que possuem perfil de hidrólise similar as carbapenemases de classe A (Figura 1). Recentemente, BKC-1 (Brazilian *Klebsiella carbapenemase*-1), uma nova carbapenemase da classe A de Ambler, foi isolada de amostras clínicas de *K. pneumoniae*, no Brasil²⁷⁻²⁹.

Na Tabela 6, são apresentados os principais fenótipos de resistência aos β -lactâmicos em *Enterobacterales*. Embora *E. coli* e *Shigella* spp. sejam portadoras de uma β -lactamase cromossômica da classe C de Ambler, que naturalmente não são expressas, ambas espécies, assim como *Salmonella enterica* e *P. mirabilis*, apresentam sensibilidade a quase todos os β -lactâmicos.

Klebsiella spp. (exceto *Klebsiella aerogenes*), *Citrobacter koseri* e *Citrobacter amalonaticus*, entre outras espécies, apresentam: i) baixa resistência às aminopenicilinas (ampicilina, amoxicilina) e às carboxipenicilinas (carbenicilina e ticarcilina); ii) sensibilidade diminuída ou intermediária a ureidopenicilinas (piperacilina); e iii) sensibilidade às cefalosporinas, aos monobactâmico (aztreonam), aos carbapenêmicos, e às associação de β -lactâmicos com inibidores de β -lactamase (ex., amoxicilina-ácido clavulânico). O fenótipo de resistência intrínseca desse grupo é relacionado à produção de uma β -lactamase cromossômica de espectro restrito, pertencente à classe A de Ambler. No caso de *K. pneumoniae*, esta enzima tem sido identificada principalmente como SHV-1. Isolados de *K. oxytoca* possuem genes cromossômicos que codificam enzimas cromossômicas do grupo OXY. Quando ocorre a hiperprodução dessas enzimas, o perfil de sensibilidade similar ao de uma ESBL é observado^{30,31}.

Enterobacter spp., *K. aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Proteus penneri*, *Citrobacter freundii*, *Providencia* spp., *Hafnia alvei*, *Serratia* spp. e *Morganella morganii*, apresentam uma cefalosporinase cromossômica induzível que, de forma geral, confere resistência a classe de aminopenicilinas e cefalosporinas de primeira geração (C1G). Entretanto, esse grupo de enterobactérias permanece sensível a ureidopenicilinas, carboxipenicilinas, cefalosporinas de terceira geração (C3G) e quarta geração (C4G), monobactâmico, e carbapenêmicos (Tabela 6).

P. penneri e *P. vulgaris* possuem β -lactamases cromossômicas da classe A, as quais conferem resistência à cefuroxima. Entretanto, ambas as espécies

apresentam sensibilidade à cefoxitina e às associações de β -lactâmicos com inibidores de β -lactamase⁷.

Yersinia enterocolitica produz duas enzimas diferentes pertencentes às classes A e C de Ambler. Portanto, a maioria das cepas dessa espécie apresentam um fenótipo induzível de produção de penicilinase e cefalosporinase, sendo resistentes a carboxipenicilinas, aminopenicilinas, amoxicilina-ácido clavulânico, e cefalosporinas de primeira e segunda gerações⁷.

Em todas essas espécies, a existência de outros mecanismos, como a diminuição de permeabilidade da membrana externa, também pode conferir resistência aos β -lactâmicos³².

Tabela 6. Principais padrões de resistência aos β -lactâmicos em função da β -lactamase produzida por *Enterobacteriales*²²⁻³¹

Fenótipo	Perfil de resistência aos β -lactâmicos										Incidência ^a	Observações	
	AMP	AMC	TIC	PIP	C1G	FOX	CXM	C3G	C4G	CBP			
<i>E. coli</i>, <i>Shigella</i>, <i>P. mirabilis</i>, <i>Salmonella</i>													
Intrínseco	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Moderada	Produção basal de AmpC em <i>E. coli</i> e <i>Shigella</i> . <i>Salmonella</i> e <i>Shigella</i> são consideradas clinicamente resistentes a C1G e C2G.
Intrínseco ^H	R	R	R	R	R	R	R	r/R	S	S	S	Baixa	Hiperprodução de AmpC em <i>E. coli</i> e <i>Shigella</i> .
β -lactamase de espectro restrito	R	S	R	r	S/r	S	S	S	S	S	S	Alta	TEM-1, TEM-2 e SHV-1.
β -lactamase de espectro restrito ^H	R	r	R	R	R	S	S	S	S	S	S	Alta	A produção de SHV-1 pode chegar a afetar ligeiramente a ação da ceftazidima.
ESBL	R	S	R	R	R	S	R	S/R	S/R	S	S	Alta	CTX-M-15, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-27
pAmpC adquirida	R	R	R	R	R	R	R	r/R	S	S	S	Alta	CMY-2
Carbapenemase	R	R	R	R	R	R	R	r	R	R	R	Alta	KPC-2, NDM-1, IMP-1, VIM-2. Cepas produtoras de MBL apresentam sensibilidade ao aztreonam.
<i>K. pneumoniae</i>, <i>K. quasipneumoniae</i>, <i>K. variicola</i>, <i>K. oxytoca</i>													
Intrínseco	R	S	R	r	S/r	S	S	S	S	S	S	Alta	SHV-1, LEN ou OKP em <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. variicola</i> ou <i>K. quasipneumoniae</i> , respectivamente. Enzimas OXY em <i>K. oxytoca</i> .
OXY ^H	R	S/R	R	R	R	S	r	S/r	S	S	S	Baixa	OXY-1 e OXY-2 em <i>K. oxytoca</i> . Quando houver resistência ao aztreonam, o isolado será considerado resistente a C3G. Adicionalmente, é observada sinergia com o ácido clavulânico

Fenótipo	Perfil de resistência aos β-lactâmicos										Incidência ^a	Observações
	AMP	AMC	TIC	PIP	C1G	FOX	CXM	C3G	C4G	CBP		
β-lactamase de espectro restrito ^H	R	r	R	R	R	S	S	S	S	S	Baixa	A hiperprodução de SHV-1 pode interferir ligeiramente na ação da ceftazidima
ESBL	R	S/r	R	R	R	S	R	S/R	S/R	S	Alta	CTX-M-15, CTX-M-2, CTX-M-59
pAmpC adquirida	R	R	R	R	R	R	R	r/R	S	S	Moderada	CMY-2
Carbapenemase	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	Alta	KPC-2, NDM-1, IMP-1, VIM-2, BKC-1. Cepas produtoras de MBL apresentam sensibilidade ao aztreonam e são resistentes a ceftazidima/avibactam. Variantes KPC-3 (KPC-23, KPC-31, KPC-36) podem conferir resistência a ceftazidima/avibactam.
<i>Enterobacter, C. freundii</i>												
Intrínseco	R	R	S	S	R	R	r	S	S	S	Alta	AmpC induzível. Considerar a possibilidade de seleção de cepas resistentes a CG3 e monobactâmico.
Intrínseco ^H	R	R	R	R	R	R	R	r/R	S	S	Alta	Perfil de resistência similar ao de isolados com pAmpC
ESBL	R	R	R	R	R	R	R	r/R	S/R	S	Alta	CTX-M-15, CTX-M-8
Carbapenemase	R	R	R	R	R	R	R	r	r	R	Alta	KPC-2, NDM-1, IMP-1, VIM-2. Cepas produtoras de MBL apresentam sensibilidade ao aztreonam.
<i>S. marcescens, M. morgani, Providencia spp.</i>												
Intrínseco	R	R	S	S	R	S	R	S	S	S	Alta	AmpC induzível. Considerar a possibilidade de seleção de cepas resistentes a G3 e monobactâmico.
β-lactamase de espectro restrito ^H	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	Moderada	As enzimas mais frequentes são TEM-1, TEM-2 e SHV-1. Considerar a possibilidade de seleção de cepas resistentes a G3 e monobactâmico.
ESBL	R	R	R	R	R	r/R	R	r/R	S/R	S	Moderada	CTX-M-15
Carbapenemase	R	R	R	R	R	R	R	r	r	r	Moderada	NDM-1, KPC-2, IMP-1, VIM-2. Cepas produtoras de MBL apresentam sensibilidade ao aztreonam.
<i>P. vulgaris, P. penneri</i>												
Intrínseco	R	S	R	S	R	S	R	S	S	S	Alta	Produção da β-lactamase cromossômica de classe A
Penicilinase	R	S	R	R	R	S	R	S	S	S	Alta	As enzimas mais frequentes são TEM-1, TEM-2 e SHV-1

AMC: amoxicilina/ácido clavulânico; AMP: ampicilina; ESBL: β-lactamase de espectro estendido; CBP: carbapenêmicos; CXM: cefuroxima; C1G: cefalosporinas de primeira geração; C3G: cefalosporinas de terceira geração e monobactâmico; C4G: cefalosporinas de quarta geração; CFO: cefoxitina; PIP: piperacilina; TIC: ticarcilina.

R: resistente; r: halos reduzidos ou CIM alta em relação ao fenótipo selvagem, mas dentro da faixa de sensibilidade; S: sensível.

^HHiperprodução.

Raro: 0-1%; Baixo: 1 a 15%; Moderado: 15-60%; Alta: 60%. Essa incidência pode variar dependendo da população estudada.

⇒ Aminoglicosídeos

O principal mecanismo de ação dos aminoglicosídeos é a inibição da síntese proteica, pela ligação à subunidade 30S do ribossomo, levando a uma leitura defeituosa do código genético dos códons do mRNA. Os principais aminoglicosídeos são amicacina, arbecacina, gentamicina, tobramicina, canamicina, neomicina, netilmicina e estreptomina^{6,33}.

A maioria das espécies da ordem *Enterobacterales* são intrinsecamente sensíveis aos aminoglicosídeos, exceto *Providencia stuartii*, espécie que carrega o gene *aac(2')-Ia* no cromossomo, o que resulta em um perfil de resistência a gentamicina, netilmicina e tobramicina, mas não à amicacina³³.

O mecanismo de resistência adquirida mais importante, e comum, em *Enterobacterales* de importância clínica é a inativação enzimática decorrente de alteração estrutural do aminoglicosídeo, mediada por enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EMA). Estas enzimas modificam o aminoglicosídeo por: i) acetilação, onde as enzimas, denominadas de acetiltransferases (AAC) acetilam um grupo amino do antimicrobiano; ii) adenilação, onde as enzimas, denominadas de nucleotidiltransferases (ANT), adenilam um grupo hidroxila; e iii) fosforilação, onde as enzimas, denominadas de fosfotransferases (APH), fosforilam um grupo hidroxila. Interessantemente, cada uma das enzimas citadas acima é capaz de reconhecer um certo número de aminoglicosídeos, resultando em um fenótipo de resistência específico (Tabela 7), o qual pode ser predito através da interpretação adequada do antibiograma^{33,34}.

Outro mecanismo de resistência aos aminoglicosídeos em *Enterobacterales* é a produção de enzimas do tipo metiltransferases (ArmA, RmtA, RmtB, RmtC, RmtD, RmtE, RmtF, RmtH e NpmA), responsáveis pela metilação da subunidade 16S do rRNA³⁴.

Tabela 7. Fenótipos de resistência aos aminoglicosídeos em *Enterobacterales*, associados com a produção de enzimas modificadoras ou metiltransferases^{33,34}

Fenótipo	Enzima	Incidência	Interpretação do antibiograma
Str	APH(3 ^o)	Alta	Resistência a estreptomomicina. Para detecção da enzima, um disco de espectinomicina pode ser adicionado ao antibiograma como discriminador entre APH(3 ^o) e a ANT(3 ^o), uma vez que a enzima APH(3 ^o) não confere resistência a espectinomicina
Str/Spc	ATN(3 ^o)	Moderada	
C, Nm	APH(3')-I	Moderada	Alto nível de resistência a canamicina e neomicina. A enzima do tipo I é mais frequente que a enzima do tipo II.
	APH(3')-II	Baixa	
G	AAC(3)-I	Baixa	Observa-se pequena redução do halo de inibição de gentamicina.
C, G, T	ANT(2 ^o)	Baixa	Redução do halo de inibição de canamicina, gentamicina. No caso da tobramicina, observa-se uma redução menor do halo de inibição quando comparado aos demais aminoglicosídeos.
C, T, G, Nt	AAC(3)-II	Moderada	Alto nível de resistência a gentamicina e tobramicina. Observa-se redução significativa do halo de inibição de netilmicina e moderada para canamicina.
	AAC(3)-IV	Baixa	
C, T, A, Nt	AAC(6')	Baixa	Alto nível de resistência a canamicina, tobramicina e netilmicina. Resistência moderada para amicacina. É possível diferenciar das demais enzimas, pois não confere resistência a gentamicina. Mecanismo de resistência apresentado essencialmente por <i>Serratia</i> spp.
G, T, Nt, Nm	AAC(2')	Baixa	Resistência moderada a gentamicina, netilmicina, tobramicina e neomicina. Dificil detecção. Resistência intrínseca em <i>Providencia</i> spp.

A: amicacina; G: gentamicina; C: canamicina; Nm: neomicina; Nt: netilmicina; Str: estreptomomicina; Spc: espectinomicina; T: tobramicina. Raro: 0-1%; Baixo: 1 a 15%; Moderado: 15-60%; Alta: 60%. Essa incidência pode variar dependendo da população estudada.

⇒ Quinolonas e fluoroquinolonas

Quinolonas (ácido nalidíxico) e fluoroquinolonas (ciprofloxacina, norfloxacina, ofloxacina, levofloxacina e moxifloxacina) agem inibindo as enzimas topoisomerases, classificadas como topoisomerases II (DNA girase) e topoisomerases IV, levando à morte celular. Com relação a isso, as topoisomerases são enzimas heterotetraméricas que participam nos processos de replicação e empacotamento de DNA, e são constituídas por 2 subunidades denominadas A e B. Os genes *gyrA* e *gyrB* codificam as subunidades A e B da enzima DNA girase, enquanto os genes *parC* e *parE* codificam as subunidades A e B da topoisomerase IV³⁵.

Os mecanismos de resistência a esses compostos estão associados a mutações dos alvos, proteção alostérica que impede a ligação da quinolona/fluoroquinolona ao alvo, e/ou bombas de efluxo³⁵.

Resistência mediada por mutação

Um dos principais mecanismos de resistência a essa classe de antimicrobianos é o desenvolvimento de mutações nos genes codificadores das subunidades das enzimas DNA girase e topoisomerase IV. Adicionalmente, bombas de efluxo podem retirar o antimicrobiano do interior da bactéria, impedindo que ele interaja com seu sítio-alvo. Em geral, a hiperexpressão de bombas de efluxo resulta em fenótipos de baixo nível de resistência; entretanto, esse mecanismo poderia facilitar a instauração de mutações nas topoisomerases, aumentando o nível de resistência e contribuindo para a seleção de isolados resistentes, ao longo prazo. De fato, as mutações relacionadas à resistência a esses compostos acontecem de forma cumulativa³⁵.

Em Gram-negativos, a DNA girase parece ser o primeiro alvo de todas as quinolonas/fluoroquinolonas. Em geral, alterações no alvo acontecem especificamente em uma região da enzima, denominada QRDR (“Quinolone Resistance-Determining Regions”, região determinante da resistência à quinolonas). Alterações nas regiões QRDR em ambas as subunidades da DNA girase e topoisomerase IV estão relacionadas a um aumento da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para todas as quinolonas/fluoroquinolonas^{35,36}.

Na interpretação do antibiograma, nos casos onde seja observada a resistência a qualquer fluoroquinolona, é importante considerar que o isolado poderá ter redução da sensibilidade a outras fluoroquinolonas, uma vez que os mecanismos de resistência conferem um fenótipo de resistência cruzada³⁶.

Resistência mediada por plasmídeos

A resistência às quinolonas mediada por plasmídeo (“Plasmid-Mediated Quinolone Resistance” – PMQR) foi reportada em 1998. Desde então, genes PMQR têm sido identificados em diversas espécies pertencentes à ordem *Enterobacterales*, principalmente em *Klebsiella* spp., *E. coli*, *Salmonella* spp., e *Enterobacter* spp. Três mecanismos são incluídos dentro do conceito PMQR: i) Qnr; ii) AAC(6′)-Ib-cr; e iii) bombas de efluxo QepA e OqxAB³⁵.

O primeiro gene PMQR foi identificado em um isolado de *K. pneumoniae* no Alabama, nos Estados Unidos da América, e foi denominado *qnrA*; ele foi associado com um baixo grau de resistência à ciprofloxacina. Genes da família *qnr* são normalmente encontrados em plasmídeos que carregam outros genes de resistência, como, por exemplo, genes codificadores de ESBLs, carbapenemases e/ou pAmpC. Proteínas da família Qnr (QnrA, QnrB, QnrS, QnrC, QnrD, QnrE, QnrVC) conferem resistência às quinolonas/fluoroquino-

lonas mediante uma proteção alostérica da DNA girase e topoisomerase IV³⁵⁻³⁷.

A variante “cr” do gene *aac(6′)-Ib* codifica uma aminoglicosídeo acetiltransferase que confere sensibilidade reduzida à ciprofloxacina, pela N-acetilação do resíduo amina do grupo piperazinil. *Aac(6′)-Ib-cr* contém 2 modificações de aminoácidos (Trp102Arg e Asp179Tyr), os quais são necessários e suficientes para capacitar essa enzima a realizar a acetilação da ciprofloxacina³⁸.

Quando *qnrA* e *aac(6′)-Ib-cr* estão presentes em um isolado, a CIM pode aumentar até 1 µg/mL. Adicionalmente, a presença de *aac(6′)-Ib-cr* aumenta a frequência de seleção de mutantes QRDR expostas a ciprofloxacina³⁵.

Um outro mecanismo PMQR está relacionado com bombas de efluxo do tipo OqxAB, que tem localização cromossômica em *K. pneumoniae* mas plasmidial em *E. coli*, e QepA, codificadas pelos genes *oqxAB* e *qepA*, respectivamente. Ambas têm sido relacionadas à diminuição da sensibilidade às quinolonas/fluoroquinolonas e seleção de mutantes com níveis de resistência mais elevadas, resultando na falha terapêutica. Em cepas que não possuem mutação QRDR, a expressão isolada de genes PMQR pode resultar em uma diminuição da sensibilidade às fluoroquinolonas, sem gerar resistência ao ácido nalidíxico. Contudo, existe grande probabilidade de seleção de mutantes com fenótipo de alto nível de resistência, sendo sugerido que esses isolados sejam considerados, pelo menos, com fenótipo de sensibilidade intermediária às quinolonas. A hiperexpressão de OqxAB confere também resistência a outros antimicrobianos, tais como tigeciclina, nitrofurantoína e cloranfenicol, além de desinfetantes³⁹.

⇒ Polimixinas

A resistência às polimixinas, colistina (polimixina E) e polimixina B tem aumentado drasticamente nos últimos anos, principalmente em *K. pneumoniae* produtora de KPC⁴⁰⁻⁴³. Essa resistência envolve a adição de 4-amino-deoxiarabinose (L-Ara4N) e/ou fosfoetanolamina (PEtN) ao lipídeo A do lipopolissacarídeo (LPS), resultando na diminuição da atração eletrostática entre as polimixinas e o LPS. No contexto genético, essa resistência surge por mutações nos genes que codificam os sistemas de dois componentes PhoPQ e PmrAB. Estes sistemas regulam a expressão de *pmrC* e do operon *pmrHFIJKLM*, responsáveis pelo processo bioquímico de adição dos resíduos PEtN e Ara4N ao lipídeo A. Outras mutações associadas à resistência às polimixinas afetam os genes *mgrB* e *crrB*, que regulam o sistema PhoPQ, e *pmrC* e o operon *pmrHFIJKLM*, respectivamente.

No Brasil, os principais eventos genéticos associados com resistências às polimixinas em *K. pneumoniae* têm sido mutações em PmrB (R256G, T246A), PhoQ (L26del, V27del, D90E, T84K, L37P, H410Y), CrrB (C68S, S195N, Q296L), e inativação insercional do gene *mgrB* pelos elementos IS*Kpn25*, IS903 e IS5⁴⁴.

Em *E. coli*, o principal mecanismo de resistência às polimixinas é mediado por genes *mcr* (“mobile colistin resistance”) carregados por plasmídeos. Genes *mcr* codificam a produção de fosfoetanolamina transferases, enzimas que transferem um resíduo de fosfoetanolamina à porção do lipídeo A do LPS, o que diminui a afinidade deste alvo pelas polimixinas carregadas positivamente, devido à repulsão eletrostática outorgada pela diminuição da carga negativa do lipídeo A.

Existem 10 variantes descritas do gene *mcr*, das quais a mais prevalente é a *mcr-1*. No Brasil, variantes *mcr-1*, *mcr-3*, *mcr-5* e *mcr-9* têm sido identificadas em medicina humana e veterinária, em isolados de *E. coli* e *Enterobacter kobei* (BioProject PRJNA615090) coprodutores de ESBL^{45,46}. Por outro lado, o gene *mcr-1* tem sido encontrado em *Salmonella* spp. e *Klebsiella pneumoniae*, nesta última espécie em linhagens coprodutoras de KPC-2, caracterizando fenótipos pan-resistentes.

3.3.5 Bacilos Gram-negativos não fermentadores da glicose

Pseudomonas aeruginosa, *Acinetobacter baumannii* e *Stenotrophomonas maltophilia* são protótipos de bactérias não fermentadoras da glicose multirresistentes. Em *P. aeruginosa*, a expressão de bombas de efluxo (MexAB-OprM), a produção de β -lactamase intrínseca, a permeabilidade reduzida da membrana, as alterações nas topoisomerasas e a versatilidade na aquisição de genes de resistência têm contribuído com esse fenótipo. De forma similar, *A. baumannii* geralmente se caracteriza pela hiperprodução de cefalosporinase cromossômica (AmpC) ou da oxacilinase OXA-51, associadas à presença de IS*Aba1* na região promotora dos genes, como também pela aquisição de várias β -lactamases de espectro restrito e/ou espectro estendido. Finalmente, a resistência intrínseca de *S. maltophilia* aos antimicrobianos de amplo espectro como carbapenêmicos (mediada pelas β -lactamases L1 e L2) e aminoglicosídeos (mediada por enzimas modificadoras de aminoglicosídeos) configuram-se como um limitante para antibioticoterapia⁴⁷⁻⁵⁰.

⇒ *Pseudomonas aeruginosa*

Resistência intrínseca

A resistência intrínseca de *P. aeruginosa* se deve a múltiplos fatores, como: i) baixa permeabilidade da célula aos fármacos (deleção da porina OprD); ii) expressão constitutiva de vários sistemas de bombas de efluxo (principalmente MexAB-OprM e MexXY-OprM); e, iii) presença de uma β -lactamase cromossômica induzível, tipo AmpC. A participação conjunta desses fatores promove a resistência intrínseca às penicilinas, às aminopenicilinas, aos inibidores de β -lactamases, às cefalosporinas de primeira e segunda geração, cefotaxima, ceftriaxona, cloranfenicol, nitrofurantoína, sulfonamidas, trimetoprima, tetraciclina, tigeciclina, e ácido nalidíxico. Por outro lado, a perda ou redução da expressão da porina OprD também contribui para resistência aos carbapenêmicos^{47,48}.

Resistência aos β -lactâmicos

Na ausência de β -lactamases adquiridas, *P. aeruginosa* apresenta sensibilidade a carboxipenicilinas (carbenicilina, ticarcilina), ureidopenicilinas (piperacilina), ceftazidima, cefepime, cefoperazona, aztreonam e carbapenêmicos (imipenem, meropenem, doripenem).

O mecanismo de resistência adquirida aos antimicrobianos β -lactâmicos mais importante nesta espécie é a produção de β -lactamases classe A, C, D (serino- β -lactamases) e B (metalo- β -lactamases)⁶.

β -lactamase AmpC

P. aeruginosa produz uma β -lactamase cromossômica induzível de classe C (AmpC), codificada pelo gene *ampC*, de forma similar que em algumas espécies da ordem *Enterobacteriales*. Em condições normais, essa enzima com atividade cefalosporinase é produzida em quantidades mínimas (baixo nível de expressão), e é responsável pela resistência a aminopenicilinas e cefalosporinas de primeira geração. Esta enzima não é inibida pela ação do ácido clavulânico, sulbactam ou tazobactam. Sua produção é induzida na presença de β -lactâmicos, como cefoxitina ou imipenem, embora esta hiperexpressão possa ser reversível quando o agente indutor é removido. A hiperexpressão de AmpC pode acontecer quando ocorrem mutações cromossômicas que afetam as proteínas envolvidas no processo de indução, o que determina uma expressão constitutiva de alto nível⁵¹.

Quando a produção de AmpC aumenta significativamente, *P. aeruginosa* expressa resistência a todos os β -lactâmicos, exceto carbapenêmicos. Contrariamente do que acontece com *Enterobacteriales*, a hiperprodução de AmpC em *P. aeruginosa* também afeta o cefepima⁵¹.

β -lactamases da classe A

Várias enzimas que compõem esse grupo já foram descritas em *P. aeruginosa*, tais como: TEM-1, TEM-2, PSE-1 (CARB-2), PSE-4 (CARB-1), CARB-3, CARB-4. As cepas produtoras de carbenicilinas (CARB) podem apresentar uma sensibilidade variável à cefepima e ao aztreonam, mas, na ausência de outros mecanismos de resistência, exibem sensibilidade à ceftazidima e carbapenêmicos (Tabela 8).

Em *P. aeruginosa*, variantes ESBLs das enzimas TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, GES, e BEL, têm sido identificadas no cromossomo, plasmídeos ou integrons (Tabela 8). Dentre as ESBLs do tipo GES, a GES-1 é caracterizada por apresentar atividade catalítica de baixo nível e baixa afinidade para a maioria dos substratos. Ao contrário da maioria das ESBLs da classe A, essa enzima tem uma forte afinidade pela cefoxitina. Já, GES-2 e GES-5 podem hidrolisar os carbapenêmicos, portanto essas variantes devem ser consideradas como carbapenemase de classe A. Outras carbapenemase classe A identificada em *P. aeruginosa* são as enzimas KPC, principalmente KPC-2⁵².

β -lactamases da classe D (oxacilinas)

As oxacilinas (OXA) são enzimas da classe D que pertencem ao grupo funcional 2d. Elas representam um grande grupo de enzimas com um espectro hidrolítico diverso que geralmente é codificado por genes integrados em plasmídeos ou integrons. Com exceção da OXA-18, essas enzimas são difíceis de detectar no laboratório em virtude da ausência da inibição por ácido clavulânico, sulbactam ou tazobactam. Oxacilinas podem ser divididas de acordo com seu espectro de atividade e diversidade genética. As enzimas clássicas OXA (OXA-1, OXA-2, OXA-10) podem determinar a resistência às carboxipenicilinas e ureidopenicilinas, mas não ceftazidima⁵³.

O subgrupo OXA-1 inclui OXA-31, que deriva de OXA-1 pela substituição de dois aminoácidos. Ambas as enzimas têm a capacidade de hidrolisar a cefepima, mas não a ceftazidima. As oxacilinas com maior importância clínica são aquelas que expressam um espectro de atividade hidrolítica estendida (OXA-11, OXA-14, OXA-15, OXA-19, OXA-32) que inclui cefotaxima, ceftazidima, cefepima, cefpiroma e aztreonam. A maioria dessas oxacilinas

têm sido identificadas exclusivamente em *P. aeruginosa*, sendo variantes de β -lactamases OXA de espectro restrito que sofreram uma mutação pontual, que confere maior atividade hidrolítica contra ceftazidima, e uma atividade hidrolítica variável contra cefepima e aztreonam (Tabela 8)⁵³.

β -lactamases da classe B (Metallo- β -lactamases)

As carbapenemases dependentes de Zn^{2+} , conhecidas como metalo- β -lactamases da classe B, conferem resistência a praticamente todos os antimicrobianos β -lactâmicos, incluindo os carbapenêmicos (Tabela 8). Os monobactâmicos, como o aztreonam, não são afetados pela atividade hidrolítica dessas enzimas. As metalo- β -lactamases não são inibidas por ácido clavulânico ou tazobactam e, em vez disso, são inibidas por quelantes catiônicos divalentes, como o EDTA. Sete tipos de metalo- β -lactamases têm sido identificados em *P. aeruginosa* (AIM, DIM, GIM, IMP, NDM, SPM e VIM). Especificamente no Brasil, SPM-1, VIM-2, e IMP-1 têm sido comuns em *P. aeruginosa*⁵⁴.

Alteração da permeabilidade (porinaOprD)

A porina OprD, em *P. aeruginosa*, é a principal via de entrada de carbapenêmicos. Portanto, a perda dessa porina leva a uma diminuição na sensibilidade a esses antimicrobianos. Em comparação com o imipenem, a entrada na célula do meropenem parece ser menos afetada, pois em cepas sem OprD, a CIM do imipenem tem um valor entre 8–32 $\mu\text{g/mL}$ e a do meropenem entre 2 – 4 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 9).

Sistemas de bombas de efluxo

A análise do genoma de *P. aeruginosa* revela que esse microrganismo possui vários sistemas de bombas de efluxo integrados em 5 superfamílias, embora predominem aqueles pertencentes à família RND (“Resistance-nodulation-cell division”). Este sistema é formado por três componentes básicos: i) uma proteína localizada na membrana citoplasmática, que atua como transportador; ii) um segundo componente representado por uma proteína de membrana externa e, iii) uma terceira proteína localizada no espaço periplásmico que une as outras duas proteínas. Os sistemas de bomba de efluxo mais frequentes em *P. aeruginosa* são MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN e MexXY-OprM. Essas bombas afetam em maior ou menor grau a atividade não apenas dos antimicrobianos β -lactâmicos e carbapenêmicos, mas também de outros antimicrobianos como fluoroquinolonas, tetraciclina, tigeciclina e cloranfenicol⁴⁸.

A hiperexpressão de MexAB-OprM determina uma diminuição na atividade de carboxipenicilinas, ureidopenicilinas, cefotaxima, ceftazidima, cefepima e aztreonam (Tabela 10). A hiperexpressão de MexCD-OprJ afeta antimicrobianos β-lactâmicos, especialmente as cefalosporinas de quarta geração (cefepime, cefpiroma). Já a superexpressão do operon *mexEF-oprN* se caracteriza por conferir resistência às fluoroquinolonas e diminuir a sensibilidade aos carbapenêmicos, especialmente imipenem. Essa perda de sensibilidade está associada a uma diminuição da porina OprD. A superexpressão de *mexXY* afeta vários antimicrobianos, principalmente cefepima⁵⁵.

Tabela 8. Fenótipos de resistência aos antimicrobianos β-lactâmicos em *Pseudomonas aeruginosa* associados à produção de enzimas^{47,48,53}

Antimicrobianos									Mecanismo de resistência (β-lactamase)
TC	TIC	PIP	PPT	CAZ	CPM	ATM	IPM	MER	
S	S	S	S	S	S	S	S	S	-
R	R	r	r	r	S/r	r	S	S	AmpC parcialmente desreprimida
R	R	R	R	R	r/R	R	S	S	AmpC totalmente desreprimida
R	S	R	S	S	S/r	S/r	S	S	β-lactamase classe A (espectro restrito ^a)
R	S/r	R	S/r	R	R	R	S	S	β-lactamase classe A (ESBL ^b)
R	S	R	S	R	R	R	r/R	r/R	GES-2, GES-5
r/R	r/R	r/R	r/R	S	R	S	S	S	OXA (espectro restrito)
R	R	R	R	R	r/R	r/R	S	S	OXA (ESBL)
R	R	R	R	R	R	S	r/R	r/R	Metalo-β-lactamase ^c
R	R	R	R	R	R	R	r/R	r/R	KPC-2

ATM: aztreonam; CAZ: ceftazidima; CPM: cefepima; IPM: Imipenem; MER: meropenem; PIP: Piperacilina; PPT: Piperacilina + Tazobactam; TC: ticarcilina; TIC: ticarcilina + clavulanato.

R: resistente; S: sensível; r: sensibilidade diminuída.

^aTEM 1, TEM-2, PSE-1, PSE-4, CARB-3, CARB-4.

^bVariante CTX-M, TEM, SHV, PER, VEB.

^cIMP-1, NDM-1, VIM-2 e SPM-1.

Tabela 9. Fenótipos de resistência aos antimicrobianos β-lactâmicos em *Pseudomonas aeruginosa* associados à perda de porinas^{47,48,53}

Fenótipos de resistência									Mecanismo de resistência (impermeabilidade)
TC	TIC	PIP	PPT	CAZ	CPM	ATM	IPM	MER	
S	S	S	S	S	S	S	R	r	Perda de Porina OprD
R	R	r/R	r/R	r/R	r/R	r/R	S	r	Sistema MexAB-OprM
r/R	r/R	r/R	r/R	r/R	R	r/R	S	S	Sistema MexCD-OprJ
r/R	r/R	r/R	r/R	r/R	r/R	r/R	R	r	Sistema MexEF-OprN ^a
r/R	r/R	r/R	r/R	r/R ^b	r/R	r/R	S	S	Sistema MexXY-OprM

ATM: aztreonam; CAZ: ceftazidima; CPM: cefepima; IPM: Imipenem; MER: meropenem; PIP: Piperacilina; PPT: Piperacilina + Tazobactam; TC: ticarcilina; TIC: ticarcilina + clavulanato.

R: resistente; S: sensível; r: sensibilidade diminuída.

^aMexEF-OprN é regulado pelo fator de transcrição MexT, que também regula negativamente a expressão de OprD, de modo que a diminuição na sensibilidade a carbapenêmicos é devida à superexpressão de MexT nesse fenótipo.

^bA sensibilidade à ceftazidima, embora diminuída, é, geralmente, mantida

Resistência aos aminoglicosídeos

O mecanismo mais importante de resistência aos aminoglicosídeos em *P. aeruginosa* é a modificação enzimática do antimicrobiano, com a consequente diminuição da afinidade desse antimicrobiano pela subunidade 30S do ribossomo (Tabela 10). As enzimas fosforiltransferases (APH), adeniltransferases ou nucleotidiltransferases (AAD ou ANT), e acetiltransferases (AAC) são codificadas por genes localizados em plasmídeos.

A metilação da subunidade 16S do RNA ribossômico também pode ser mediada por enzimas codificadas por genes mobilizados por plasmídeos. Esse mecanismo de resistência confere alto nível de resistência à amicacina, tobramicina, netilmicina e gentamicina (Tabela 10). No Brasil, as metilases 16S RNAr RmtD e RmtG têm sido frequentemente reportadas em *P. aeruginosa*⁵⁶.

Resistência às fluoroquinolonas

A resistência às fluoroquinolonas em *P. aeruginosa* ocorre principalmente por alterações estruturais no alvo (DNA girase e topoisomerase IV) ou pela expressão de bombas de efluxo. Como para os β-lactâmicos, a superexpressão dos sistemas de bombas de efluxo também pode contribuir para a resistência às fluoroquinolonas (Tabela 10).

Tabela 10. Fenótipos de resistência aos aminoglicosídeos e às fluoroquinolonas em *Pseudomonas aeruginosa*^{47,48,53}

Antibacterianos					Mecanismo de resistência
GEN	TOB	NET	AMI	CIP	
S	S	S	S	S	–
R	S	S	S	–	AAC(3)-I
R	R	R	S	–	AAC(3)-II
S/r	R	R	R	–	AAC(6')-I
R	R	R	S	–	AAC(6')-II
R	R	S	S	–	ANT(2')-I
R	R	R	R	–	Metilação ribossômica (RmtD, RmtG)
r/R	r/R	r/R	r/R	r/R	Sistema de bomba de efluxo MexXY-OprM
–	–	–	–	r/R	Sistemas de bombas de efluxo (MexAB-OprM, CD-OprJ, EF-OprN)
–	–	–	–	r	Mutação em <i>gyrA</i>
–	–	–	–	R	Mutação em <i>gyrA</i> e <i>parC</i>

AMI: amicacina; CIP: ciprofloxacina; GEN: gentamicina; NET: netilmicina; TOB: tobramicina.
R: resistente; r: sensibilidade diminuída; S: sensível.

Resistência às polimixinas

A resistência às polimixinas, embora pouco reportada em *P. aeruginosa* no Brasil, pode ser causada por mutações nos sistemas de dois componentes (PhoP/PhoQ ou PmrA/PmrB), reguladores da transcrição que controlam as modificações do LPS. Mutações nos genes de outro sistema de dois componentes, ParRS/CprRS, também podem ter participação no desenvolvimento de resistência às polimixinas⁵⁷. Adicionalmente, a inativação da proteína MgrB (regulador de *feedback* negativo do sistema PhoP-PhoQ) pode contribuir para a resistência às polimixinas. Alterações no sistema de dois componentes podem produzir modificações no LPS, que resultam na adição de resíduos 4-amino-4-deoxy-L-arabinose na porção do lipídeo A^{58,59}.

⇒ ***Acinetobacter baumannii***

Resistência aos β -lactâmicos

A. baumannii é a espécie mais prevalente do gênero em amostras clínicas humanas, sendo considerado um patógeno oportunista, frequentemente multirresistente, associado a infecções nosocomiais⁶⁰. *A. baumannii* é resistente à maioria dos β -lactâmicos, especialmente penicilinas e cefalosporinas. Assim, é atípico encontrar uma cepa com um fenótipo que possua uma sensibilidade total aos β -lactâmicos.

A resistência à ampicilina, carboxipenicilinas e ureidopenicilinas tem sido associada à presença de β -lactamases plasmidiais de espectro restrito, como variantes TEM-1, TEM-2 e SHV-1. No entanto, a superexpressão de uma cefalosporinase cromossômica do tipo AmpC, também chamada de ADC (cefalosporinase derivada de *Acinetobacter*), pode ser o mecanismo mais comum de resistência aos β -lactâmicos, e gera um fenótipo de resistência à ampicilina, cefalotina, piperacilina, cefotaxima e ceftazidima (Tabela 11). Essa cefalosporinase cromossômica pode ser expressa em um baixo nível e, nesses casos, não confere resistência à ceftazidima. A superexpressão do gene *bla*_{ADC} está associada à presença de uma sequência de inserção (ISAba1) inserida na região promotora deste gene. A sequência de inserção mencionada exibe um promotor que é utilizado pela RNA polimerase para expressar a cefalosporinase. Assim, a hiperprodução de ADC confere resistência à ticarcilina, cefotaxima, ceftazidima, cefepima e aztreonam, sem afetar a ceftaxima ou os carbapenêmicos (Tabela 11). A superprodução de ADC é um fenótipo comum em *A. baumannii*. De fato, a sequência de inserção ISAba1 pode ser encontrada em grande parte dos isolados clínicos, associada com a região promotora do gene *bla*_{ADC}, conferindo resistência à ceftazidima⁶⁰.

As estirpes resistentes às cefalosporinas de terceira geração, que não exibem uma superprodução de ADC, podem possuir uma ESBL. Vários tipos de ESBLs foram descritos em *A. baumannii*, dentre os quais encontramos variantes PER (PER-2), OXA (OXA-37), CTX-M (CTX-M-2, CTX-M-15), TEM (TEM-92), SHV (SHV-5, SHV-12), e VEB-1.

A produção de carbapenemases, como KPC-2, tem sido cada vez mais reportada nesta espécie, porém, carbapenemases do tipo OXA têm sido mais frequentes. OXA-51 ou suas variantes (OXA-64, OXA-65, OXA-67, OXA-69, OXA-70, OXA-88, OXA-120, OXA-132 ou OXA-219) são intrínsecas em *A. baumannii*. Em condições normais, essa enzima tem uma atividade fraca contra carbapenêmicos. No entanto, a superexpressão do gene *bla*_{OXA-51} também está associada com sequência de inserção *ISAbal* que se insere na região promotora do gene, aumentando a atividade hidrolítica contra carbapenêmicos^{61,62}.

Além dessa oxacilinase cromossômica com atividade de carbapenemase, *A. baumannii* pode adquirir outras 5 classes de oxacilinases com atividade contra carbapenêmicos: i) oxacilinases do grupo OXA-23 (que inclui OXA-23, OXA-27 e OXA-49); ii) grupo OXA-24/40 (que inclui OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-40, OXA-72, OXA-160 e OXA-182); iii) grupo OXA-58 (que inclui OXA-96 e OXA-97); iv) grupo OXA 235 (com subgrupo OXA-235); e v) OXA-143 (com variantes OXA-231 e OXA-253). No Brasil, a produção de OXA-23, OXA-58, OXA-72, OXA-143, OXA-231 e OXA-253 tem sido reportada⁶⁰⁻⁶².

Metallo-β-lactamases IMP-1, IMP-10 e NDM -1, conferindo um alto nível de resistência aos carbapenêmicos (CIM > 32 µg/mL), além de conferir resistência a todos os β-lactâmicos exceto o aztreonam, têm sido reportadas em isolados clínicos de *A. baumannii* e outras espécies do gênero no Brasil⁶³⁻⁶⁵. A expressão reduzida de proteínas de membrana externa confere resistência ao imipenem. Especificamente, 3 proteínas com peso molecular de 33 a 36 kDa, 29 kDa (CarO), e 43 kDa (homóloga a OprD de *P. aeruginosa*) têm sido caracterizadas⁶⁶.

Resistência aos aminoglicosídeos

Diversas enzimas modificadoras de aminoglicosídeos são reportadas em *A. baumannii* (Tabela 12). A presença frequente de duas ou mais enzimas em uma mesma cepa determina, em muitos casos, padrões de resistência difíceis de inferir a partir do antibiograma. A resistência a todos os aminoglicosídeos pode ser devido à combinação de várias enzimas modificadoras ou devido à hiperexpressão de um sistema de bomba de efluxo codificado pelo

operon AdeABC. Tal hiperexpressão também afeta a sensibilidade à tigeciclina, sendo o principal responsável pelo aumento da CIM de tigeciclina em *A. baumannii*⁶⁷.

Resistência às Fluoroquinolonas e Polimixinas

A resistência às fluoroquinolonas também está associada a mutações nos genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE*. Adicionalmente, a hiperexpressão de uma ou várias bombas de efluxo também pode desempenhar um papel fundamental na expressão de resistência às fluoroquinolonas. Também já foi descrita a resistência mediada pelo gene *qnrS*^{35,68}.

Como para outras espécies Gram-negativas, a resistência à colistina e polimixina B em *A. baumannii* está associada a mutações no sistema de dois componentes PmrA/PmrB, com consequente modificação do lipídeo A. Além disso, recentemente foi descrita a presença do gene plasmidial *mcr-4.3* em isolados dessa espécie^{69,70}.

Tabela 11. Fenótipos de resistência a antimicrobianos β -lactâmicos em *Acinetobacter baumannii*⁴⁹

Antimicrobianos							Mecanismo de resistência (β -lactamase)
AMP	TC	PIP	CTX	CAZ	CPM	IPM	
R	S	S	S	S	S	S	Baixo nível de expressão de AmpC
R	R	R/r	R	R	R/r	S	Alto nível de expressão de AmpC
R	R	R/r	R	R	S	S	ESBLs*
R	R	S/R	S/R	S/R	S/R	R/r	Carbapenemase**
R	R	R	R	R	R	R	Carbapenemase + AmpC

AMP: ampicilina; CAZ: ceftazidima; CPM: Cefepime; CTX: cefotaxima; IPM: Imipenem; PIP: piperacilina; TC: ticarcilina.

R: resistente; r: sensibilidade diminuída; S: sensível.

*Padrão gerado pela OXA-37.

**A CIM gerada pela presença de oxacilinases (OXA-23, OXA-58, OXA-72, OXA-143, OXA-231 e OXA-253) com atividade de carbapenemase pode ser baixa, mas se simultaneamente ocorre uma redução na quantidade de porinas associada à resistência aos carbapenêmicos, poderá haver um aumento na CIM. Além disso, a associação dessas oxacilinases com hiperexpressão de enzimas ADC ou OXA-51 podem levar à resistência às cefalosporinas e carbapenêmicos. Carbapenemases do tipo NDM-1 e KPC-2 conferem resistência às penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos.

Tabela 12. Fenótipos de resistência aos aminoglicosídeos e quinolonas/fluoroquinolonas em *Acinetobacter baumannii*⁴⁹

Aminoglicosídeos					Principal mecanismo de resistência
GEN	TOB	NET	AMI	SP	
S	S	S	S	S	-
R	S	S	S	S	AAC(3)-I
R	R	R	S	S	AAC(3)-II
S	R	R	R	S	AAC(6)-I
S	S	S	S	R	ANT(3")
R	R	S	S	S	ANT(2")-I
S	S	S	R	S	APH(3')-VI
R	R	R	R	R	Enzimas + bomba de efluxo (AdeABC)
Quinolonas/fluoroquinolonas					
NAL	CIP	LVX			
S	S	S			-
R	R	S			Mutação em <i>gyrA</i> + bombas de efluxo
R	R	R			Mutações em <i>gyrA</i> e <i>parC</i> + bombas de efluxo

Aminoglicosídeos, AMI: amicacina; GM: gentamicina; NET: netilmicina; SP: espectinomicina; TOB: tobramicina. Quinolonas, CIP: ciprofloxacina; LVX: levofloxacina; NAL: ácido nalidíxico.
R: resistente; S: sensível.

⇒ *Stenotrophomonas maltophilia*

S. maltophilia é intrinsecamente resistente a vários antimicrobianos, incluindo carbapenêmicos. Outro agravante é que esse patógeno tem facilidade para adquirir genes de resistência a outros antimicrobianos, como tetraciclina e aminoglicosídeos, através de elementos genéticos móveis⁷¹.

Resistência aos β-lactâmicos

Para *S. maltophilia*, a impermeabilidade da membrana externa é um fator que pode contribuir para a resistência intrínseca basal aos antimicrobianos β-lactâmicos. A baixa permeabilidade pode estar relacionada à redução na quantidade de porinas. No entanto, vários sistemas de bombas de efluxo descritos parecem também contribuir com a resistência intrínseca. Por outro lado, a produção conjunta de duas β-lactamases codificadas por genes cromossômicos contribui para a resistência intrínseca a todos os β-lactâmicos, incluindo carbapenêmicos (Tabela 13). Com relação a isto, a β-lactamase cromossômica L1 é dependente do Zn⁺⁺, e possui notável atividade contra o imipenem e o meropenem, não hidrolisando o aztreonam. Como o resto das metalo-β-lactamases, esta enzima não é inibida pelo ácido clavulânico, mas

é inibida pelo EDTA. A segunda β -lactamase cromossômica denominada L2 é do tipo serino- β -lactamase, possuindo atividade de cefalosporinase, e adicionalmente, hidrolisa o aztreonam. Esta enzima é sensível aos inibidores de β -lactamase. Tanto L1 como L2 são induzíveis⁵⁰.

Resistência aos aminoglicosídeos

Alguns isolados de *S. maltophilia* produzem enzimas que modificam os aminoglicosídeos, como acetil ou nucleotidiltransferases, incluindo AAC(6')Iz, que inativa a tobramicina e a amicacina. Essas enzimas são prevalentes em *S. maltophilia* (Tabela 14). No entanto, o principal mecanismo de resistência que explica a baixa atividade dos aminoglicosídeos contra *S. maltophilia* é a redução da incorporação deste antimicrobiano pela célula bacteriana. Esse fenômeno pode ser devido a alterações nas proteínas da membrana externa, ou nos lipopolissacarídeos⁵⁰.

Resistência às Quinolonas/Fluoroquinolonas

A resistência às quinolonas em *S. maltophilia* difere de outros patógenos Gram-negativos não fermentadores da glicose, uma vez que mutações em genes *gyrA* e *parC* parecem ser pouco frequentes no desenvolvimento da resistência às quinolonas/fluoroquinolonas. No genoma desta espécie existe um gene semelhante ao *qnr*, comumente descrito em *Enterobacterales*, o qual confere resistência às quinolonas pela proteção das topoisomerases. Esse gene denominado *Smqnr* confere resistência intrínseca às quinolonas (Tabela 14)⁷².

Entre os agentes antimicrobianos com maior atividade contra esse microrganismo está sulfametoxazol-trimetoprima (cotrimoxazol), considerado o antimicrobiano de primeira escolha, assim como minociclina e doxiciclina.

Tabela 13. Fenótipos de resistência a β -lactâmicos e aminoglicosídeos e quinolonas em *Stenotrophomonas maltophilia*⁵⁰

β -lactâmicos						Mecanismo de resistência
AMP	TIC	PIP	CTX	IMP	ATM	
R	R	R	R	R	S	β -lactamase L1
R	S	r	R	S	R	β -lactamase L2
R	R	R	R	R	R	β -lactamases L1 + L2 ^a

AMP: ampicilina; ATM: aztreonam; CTX: cefotaxima; IMP: Imipenem; PIP: piperacilina; TIC: ticarcilina + ácido clavulânico; R: resistente; r: sensibilidade diminuída; S: sensível.

^aMecanismo mais comum de resistência

Tabela 14. Resumo dos mecanismos de resistência em *Stenotrophomonas maltophilia*⁵⁰

Mecanismo	Perfil de resistência
β -lactamases L1 e L2	β -lactâmicos
Sulfonamida hidrolase (Sul1, Sul2, Sul3)	Sulfonamidas, trimetoprima/sufametoxazol
Expressão de bombas de efluxo SmeDEF, SmeABC	Ciprofloxacina/fluoroquinolonas, tetraciclina, meropenem, cloranfenicol
Expressão de bomba de efluxo SmeIJK	Tetraciclina, aminoglicosídeos, ciprofloxacina
Expressão de bomba de efluxo SmeOP	Aminoglicosídeo, macrolídeos, doxiciclina, quinolonas
Expressão de bomba de efluxo SmeVWX	Quinolonas
Expressão de bombas de efluxo SmeYZ ⁷³	Aminoglicosídeos
Enzimas modificadoras de aminoglicosídeos AAC(6')-Iz, ANT(3'') (9)	Aminoglicosídeos
Proteína Smqnr	Quinolonas e fluoroquinolonas
Mutação na região QRDR na DNA girase e topoisomerase IV	Quinolonas e fluoroquinolonas
Fosfoglicomutase SpgM	Ceftazidima, gentamicina, ácido nalidíxico, piperacilina-tazobactam, polimixina B, colistina, ticarcilina-ácido clavulânico

3.3.6 *Neisseria* spp.

Entre as várias espécies de *Neisseria* spp., apenas *Neisseria gonorrhoeae* e *Neisseria meningitidis* são patogênicas ao homem. *N. meningitidis* causa meningites consideradas muito graves, mas permanece ainda bastante sensível às terapias antimicrobianas disponíveis. De fato, cobertura vacinal e acesso à possibilidade de diagnóstico precoce são os mais críticos aspectos no controle de infecções por esse microrganismo. Em contraste, *N. gonorrhoeae* causa uma infecção com alta incidência, mas de gravidade baixa ou moderada, e apresenta alarmantes índices de resistência aos antimicrobianos. *N. gonorrhoeae* é o agente causador da infecção sexualmente transmissível (IST) gonorreia, sendo o ser humano seu único hospedeiro natural. Esta bactéria é capaz de se aderir às células epiteliais presentes em mucosas, como a oral, urogenital, retal e conjuntiva.

Por ser uma bactéria Gram-negativa, o envoltório celular de *N. gonorrhoeae* a torna intrinsecamente resistente a lincosamidas e aos glicopeptídeos. *N. gonorrhoeae* é também resistente às polimixinas, graças à ação de uma enzima transferase codificada pelo gene *lptA* que adiciona resíduos de fosfoetanolaminas aos grupos fosfato de lipídeo A, num mecanismo associado à resistência a defensas humanas. Além disso, *Neisseria* spp. são intrinsecamente menos sensíveis a trimetoprima, uma vez que a enzima dihidrofolato redutase que expressam apresenta baixa afinidade por este antimicrobiano⁷³⁻⁷⁶.

Na maioria dos países a gonorreia é tratada sem que seja feita cultura para isolamento do microrganismo ou teste de sensibilidade aos antimicrobianos. Isso torna necessário o estabelecimento de protocolos de tratamento a partir do diagnóstico sintromico, o qual é normalmente determinado com base no perfil de susceptibilidade local, ou, na ausência deste dado, seguindo recomendações da OMS⁷⁷. Até os dias de hoje, cinco antimicrobianos foram extensivamente usados para o tratamento de gonorreia (penicilina, tetraciclina, ciprofloxacina, cefalosporinas de terceira geração, como cefixima e ceftriaxona, e azitromicina) e, para todos estes, *N. gonorrhoeae* desenvolveu ou adquiriu mecanismos de resistência. Faz ainda parte da estratégia terapêutica de muitos países a espectinomicina, antimicrobiano para o qual relatos de resistência são menos frequentes⁷³⁻⁷⁷.

⇒ Penicilina

A penicilina, descoberta por Alexander Fleming em 1928, pertence à classe dos β -lactâmicos. Esses antimicrobianos atuam inibindo a transpeptidação, reação final da síntese de peptidoglicano, maior responsável pela rigidez da parede celular bacteriana. A penicilina foi usada para tratar gonorreia desde a década de 1940 até a década de 1980. Ao longo desse tempo, um constante e gradual aumento da CIM foi observado. Desde os primeiros registros de diminuição de sensibilidade até a resistência plena, a dose eficiente de penicilina para o tratamento de gonorreia aumentou em 24 vezes (de 2,0 para 4,8 milhões U) e a CIM variou de $\leq 0,015 \mu\text{g/ml}$ para $2 \mu\text{g/ml}$ ⁷⁸.

Mecanismos associados a essa variação de CIM estão relacionados a mutações cromossômicas em genes codificadores de transpeptidases como PBP1 (*ponA*), mas principalmente PBP2 (*penA*), e a genes codificadores de proteínas relacionadas à regulação da concentração periplasmática do antimicrobiano. Entre estas, pode-se citar a porina PorB (*penB*), a secretina de pilus tipo IV pilQ (*penC*), e o regulador negativo da expressão da bomba de efluxo MtrCDE, MtrR (*mtrR*). Este gene, quando truncado ou não expresso, leva à hiperexpressão da respectiva bomba. Mutações cumulativas nestes genes podem elevar a CIM a até $4 \mu\text{g/ml}$ ^{73,78}.

Contudo, a aquisição de plasmídeos carregando β -lactamases aumenta dramaticamente a CMI para valores superiores a $16 \mu\text{g/mL}$. Até hoje apenas genes codificadores das β -lactamases TEM-1, TEM-135 e TEM-220 foram identificados em *N. gonorrhoeae*. Tais genes têm sido detectados em plasmídeos geneticamente relacionados, que apresentam tamanhos e sítios de inserção/deleção diferentes e são nomeados conforme sua origem epidemiológica. Os plasmídeos Ásia (7.426 pb), África (5.588 pb), e Toronto/Rio (5.154 pb) são

os mais descritos associados a bla_{TEM} em *N. gonorrhoeae*. No entanto, outros como Nimes (6.798 pb), New Zealand (9.309 pb), Johannesburg (4.865 pb), e Australian (3.269 pb) também já foram identificados^{78,79}.

⇒ **Tetraciclina**

A tetraciclina, antimicrobiano que se liga à porção 50S do ribossoma, afetando a síntese de proteínas, foi utilizada como alternativa à penicilina durante cerca de 40 anos. A sensibilidade de *N. gonorrhoeae* à tetraciclina também é reduzida pela superexpressão de MtrCDE ou mutações em PorB. Outra mutação que interfere na ação da tetraciclina é a substituição Val57Met na proteína ribossômica 10S (*rpsJ*), o que reduz a afinidade do antimicrobiano pelo alvo. Combinados, esses mecanismos permitem que cepas gonocócicas atinjam resistência à tetraciclina com CIM de 2 -8 µg/ml⁸⁰.

Durante a década de 1980, cepas de *N. gonorrhoeae* com CIM ≥ 16 µg/mL passaram a ser detectadas. O mecanismo associado à resistência a altas concentrações de tetraciclina é a proteína TetM. TetM tem estrutura semelhante ao fator de alongação da tradução EF-G, mas com maior afinidade pelo ribossoma. Assim, TetM compete pelo mesmo sítio que o EF-G e a tetraciclina, bloqueando o acesso do antimicrobiano a seu alvo na subunidade 50S do ribossoma bacteriano. Esse mecanismo é codificado por genes de ocorrência plasmidial (*tetM*). Dois plasmídeos muito parecidos, conhecidos como American e Dutch, ambos com peso molecular de 25,2 MDa, são associados a *tetM* em *Neisseria gonorrhoeae*.

⇒ **Ciprofloxacina**

Ciprofloxacina, uma fluoroquinolona, interfere na síntese de DNA por se ligar ao complexo topoisomerases-DNA durante eventos de abertura da dupla fita para relaxamento de superenrolamento ou decatenação, estabilizando o complexo e afetando a viabilidade celular. A ciprofloxacina foi o fármaco recomendado para tratamento de gonorreia na maior parte dos países em meados da década de 1980, tendo seu uso sido descontinuado gradualmente, devido às altas taxas de resistência a este antimicrobiano.

A resistência a ciprofloxacina em gonococos é causada principalmente por mutações nos genes *gyrA* e *parC*, codificadores da porção que se liga transientemente ao DNA nas Topoisomerases II e IV, respectivamente. Mutações que alteram a identidade de aminoácidos na QRDR, mais frequentemente nas posições 91, 95 e/ou 120 em GyrA, 87 e 91 em ParC, impactam na ação do antimicrobiano. Duas ou mais mutações nestas regiões podem levar à

resistência à ciprofloxacina. Quanto maior o número de mutações na QRDR, incluindo algumas posições em *gyrB* e *parE*, maior é o impacto sobre a CIM de ciprofloxacina⁷³.

⇒ Azitromicina

A azitromicina atua inibindo a síntese proteica, uma vez que se liga ao RNA ribossômico 23S (23S rRNA), o qual está localizado na subunidade 50S do ribossoma bacteriano, impedindo a translocação do RNA transportador e, conseqüentemente, a formação da cadeia polipeptídica. Azitromicina foi utilizada por poucos anos como monoterapia para tratar infecções sexualmente transmissíveis bacterianas em alguns países. Atualmente, esse antimicrobiano é prescrito sempre combinado à ceftriaxona ou a outros antimicrobianos. Amostras resistentes à azitromicina são reportadas desde o final dos anos 1990, mas a porcentagem de amostras resistentes tem crescido muito nos últimos 10 anos em todo o mundo⁸¹.

Os mecanismos de resistência à azitromicina presentes no gonococo estão relacionados a modificações no sítio-alvo desse antimicrobiano no ribossoma ou pela expressão aumentada de bombas de efluxo. A CIM de azitromicina sobre gonococos pode aumentar para 0,5 µg/mL em decorrência da expressão aumentada da bomba de efluxo MtrCDE, por uma deleção no promotor ou truncamento do gene que codifica o seu repressor *mtrR*. Outro mecanismo adquirido que provoca pequena alteração da CIM é a aquisição do gene *mef*, que está localizado em plasmídeos e codifica uma bomba de efluxo.

A resistência a azitromicina também pode ser mediada por genes *erm*, adquiridos por transposons conjugativos. Os genes *erm* codificam enzimas que induzem a metilação de uma adenina presente no 23S rRNA, bloqueando a ligação do macrolídeo ao seu alvo ribossomal. Enzimas codificadas pelo gene *erm* podem elevar a CIM para 1 – 4 µg/mL. Mutações específicas no gene *rplD*, que codifica a proteína ribossomal L4, também podem contribuir para a resistência a azitromicina. Neste caso, uma vez que essa proteína é localizada próxima ao domínio V da peptidil transferase, uma substituição Gly70Asp induz alteração na conformação do mesmo, tornando-o menos sensível à ação do antimicrobiano.

No entanto, o mais impactante mecanismo de resistência a azitromicina em gonococos são as mutações C2599T e A2143G no próprio domínio V da peptidil transferase (domínio funcional do 23S rRNA), codificada pelo gene *rpl*. *N. gonorrhoeae* tem 4 alelos deste gene. Quanto maior o número de alelos

mutados, maior a CIM para azitromicina, podendo atingir valores de até 256 µg/mL⁸¹.

⇒ **Cefalosporinas de espectro estendido (CEE): cefixima e ceftriaxona**

As cefalosporinas de espectro estendido (CEE) são β-lactâmicos e atuam da mesma forma que as penicilinas, com elevada potência contra bactérias Gram-negativas. Mecanismos que aumentam a CIM para penicilina, como mutações no gene *porB* (especialmente que alteram aminoácidos G101 e A102) e a expressão aumentada da bomba de efluxo MtrCDE, também interferem na CIM de CEE, sem, no entanto, levá-la a níveis de resistência.

O mecanismo mais importante de resistência à ceftriaxona em amostras de *N. gonorrhoeae* está relacionado à aquisição de diferentes alelos mosaico do gene *penA*. Estes mosaicos levam à codificação de uma PBP2 com 60 a 70 mudanças em aminoácidos com relação ao que seria a PBP2 selvagem, a qual deixa de ser facilmente reconhecida pelas CEE. Acredita-se que mosaicos *penA* tenham sido adquiridos por cepas de gonococos *in vivo* por meio de transferência horizontal durante infecções gonocócicas na orofaringe, por meio de recombinação de DNA de espécies de *Neisseria* comensais, tais como *Neisseria perflava*, *Neisseria flavescens* e *Neisseria sicca*. Entre os mais de 2000 alelos *penA* já descritos, alguns são considerados epidemiologicamente relevantes (como *penAX* e *penAXXXIV*), tendo sido relacionados a clones específicos com baixa susceptibilidade às CEE. A resistência a CEE é geralmente alcançada por mutações pontuais nestes mosaicos *penA*⁸².

⇒ **Espectinomicina**

A espectinomicina é citada em muitos protocolos terapêuticos para gonorreia como uma alternativa às CEEs, por exemplo, no caso de pacientes alérgicos às penicilinas. Este antimicrobiano, um aminoglicosídeo, atua ligando-se no 16S rRNA da subunidade 30S do ribossoma bacteriano, bloqueando a translocação do RNA transportador do sítio A para o sítio P inibindo assim a tradução do mRNA. A interação com o 16S rRNA ocorre na hélice 34 onde há os pares de bases G1064 – C1192.

A resistência à espectinomicina reportada em isolados de *N. gonorrhoeae* é resultado de mutações pontuais na hélice 34 do 16S rRNA, na qual há a substituição de citosina por timina na posição 1192 (C1192T); ou mutações (deleção Val25, ou substituições Thr24Pro ou Lys26Glu) na proteína ribossomal S5 (codificada pelo gene *rpsE*), componente da subunidade 30S do ribossoma bacteriano. Tais alterações na proteína S5 provavelmente interrompem sua

ligação ao 16S rRNA. Mutações C1192T e Thr24Pro elevam dramaticamente a CIM para o espectinomicina (>1.024 µg/mL)⁷³.

Tabela 15. Resumo dos mecanismos de resistência a antimicrobianos adquiridos que ocorrem em *N. gonorrhoeae*⁷³⁻⁷⁶

Antimicrobiano	Ocorrência	Mecanismos	Incidência	Fenótipo ^a
Penicilina	Cromossômica	Alterações em PorB Alterações em PBP1 Alterações em PilQ Superexpressão da bomba MtrCDE	Alta Baixa Baixa Alta	SR, r quando combinados
	Plasmidial	β-lactamase <i>bla</i> _{TEM}	Moderada	R
Tetraciclina	Cromossomal	Mutações em PorB Mutações na proteína ribossomal 10S Superexpressão da bomba MtrCDE	Alta Baixa Alta	SR, r quando combinados
	Plasmidial	Proteção ribossomal TetM	Moderada	R
Azitromicina	Cromossomal	Mutações na proteína ribossomal L4 Superexpressão da bomba MtrCDE	Baixa Alta	SR, r quando combinados
	Plasmidial Transposon	Efluxo por bomba <i>mef</i> Metilação do rRNA por genes <i>erm</i>	Baixa Baixa	SR, r quando combinados
	Cromossomal	Mutações nos alelos do gene <i>rrl</i> que codifica o 23S rRNA	Moderada	r/R, dependendo do tipo e número de mutações
Cefixima e Ceftriaxona	Cromossomal	Alterações em PorB Alterações pontuais/PBP2 mosaico Superexpressão de MtrCDE	Alta Moderada Alta	SR
	Cromossomal	PBP2 mosaico (algumas variantes) com ou sem mutações pontuais adicionais	Baixa	r/R
Espectinomicina	Cromossomal	Mutações em 16S rRNA Mutações na proteína ribossomal S5	Baixa Baixa	r/R dependendo das mutações

^aSR: sensibilidade reduzida; r: resistência a baixas concentrações do antimicrobiano; R: resistência a altas concentrações do antimicrobiano

3.3.7 Micobactérias

⇒ Taxonomia

A revisão das características genômicas das espécies de crescimento rápido do gênero *Mycobacterium* resultou na atualização da sua taxonomia, com a realocação de algumas espécies em quatro novos gêneros designados *Mycolicibacter*, *Mycolicibacterium*, *Mycobacteroides*, *Mycolicibacillus*⁸³. A Tabela 16

lista as espécies de crescimento rápido mais frequentemente encontradas como agente de infecções em humanos e sua taxonomia atual. Dentre as micobactérias de crescimento rápido, os três complexos de maior importância clínica são *Mycobacteroides abscessus*, *Mycobacteroides chelonae* e *Mycobacterium fortuitum*. As espécies de crescimento lento não sofreram alteração taxonômica em relação ao gênero, mas algumas espécies novas pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* foram descritas. Atualmente compõem o complexo *M. tuberculosis* as espécies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. canettii* e *M. pinnipedii*; portanto, exceto onde houver alguma particularidade, as características de resistência intrínseca serão descritas em relação ao complexo *M. tuberculosis*. Outras espécies, a exemplo de "*M. mungi*", "*M. orygis*" e "*M. suricattae*" foram propostas como membros do complexo *M. tuberculosis*, mas ainda não foram aceitas na nomenclatura oficial de procariotos (www.bacterio.net).

⇒ **Localização dos determinantes genéticos da resistência antimicrobiana em micobactérias**

Nas micobactérias de crescimento rápido várias publicações já demonstraram a presença de plasmídeos com genes de resistência a antimicrobianos, incluindo resistência a aminoglicosídeos, fosfomicina e tetraciclina^{84,85} apesar da localização dos genes determinantes de resistência intrínseca ser cromossômica e a resistência adquirida, na maioria absoluta das vezes ser decorrente de mutações de genes cromossômicos.

Até o momento, não foram descritos plasmídeos no complexo *M. tuberculosis* e a resistência antimicrobiana adquirida é, portanto, decorrente de mutações espontâneas, que ocorrem na frequência de 1 a cada 10^6 bactérias para isoniazida e pirazinamida e 1 a cada 10^8 bactérias para rifampicina. Este é o racional para o uso de três ou quatro antimicrobianos simultaneamente para o tratamento da tuberculose⁸⁶.

⇒ **O envelope celular como uma barreira à penetração de antimicrobianos**

A principal estrutura celular que diferencia as micobactérias dos demais grupos de bactérias é o envelope celular que, neste grupo, apresenta conteúdo lipídico de cerca de 60%, em sua maioria constituída por ácidos micólicos. Essa estrutura representa uma barreira hidrofóbica à entrada de compostos hidrofílicos e a sua efetividade é indiretamente comprovada pela observação de que mutantes deficientes na síntese de lipídeos mostram-se sensíveis aos antimicrobianos com características hidrofílicas⁸⁷. Além disso, as micobactérias, quando comparadas aos demais grupos, têm um baixo número de po-

rinas em seu envelope celular⁸⁸, as quais, a princípio, são a via de entrada de antimicrobianos hidrofílicos a exemplo de aminoglicosídeos e β -lactâmicos.

Tabela 16. Taxonomia atual das espécies de micobactérias de crescimento rápido mais frequentes em infecções humanas⁸³

Nomenclatura anterior	Nomenclatura atual	Complexo
<i>Mycobacterium abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<i>Mycobacteroides abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>
<i>Mycobacterium abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	<i>Mycobacteroides abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	
<i>Mycobacterium abscessus</i> subsp. <i>Bolletii</i>	<i>Mycobacteroides abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	
<i>Mycobacterium chelonae</i>	<i>Mycobacteroides chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>
<i>Mycobacterium franklinii</i>	<i>Mycobacteroides franklinii</i>	
<i>Mycobacterium immunogenum</i>	<i>Mycobacteroides immunogenum</i>	
<i>Mycobacterium salmoniphilum</i>	<i>Mycobacteroides salmoniphilum</i>	
<i>Mycobacterium saopaulense</i>	<i>Mycobacteroides saopaulense</i>	
<i>Mycobacterium boenickei</i>	<i>Mycolicibacterium boenickei</i>	
<i>Mycobacterium brisbanense</i>	<i>Mycolicibacterium brisbanense</i>	
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	<i>Mycolicibacterium fortuitum</i>	
<i>Mycobacterium fortuitum</i> subsp. <i>acetamidolyticum</i>	<i>Mycolicibacterium fortuitum</i> subsp. <i>acetamidolyticum</i>	
<i>Mycobacterium fortuitum</i> subsp. <i>Fortuitum</i>	<i>Mycolicibacterium fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i>	
<i>Mycobacterium houstonense</i>	<i>Mycolicibacterium houstonense</i>	
<i>Mycobacterium neworleansense</i>	<i>Mycolicibacterium neworleansense</i>	
<i>Mycobacterium peregrinum</i>	<i>Mycolicibacterium peregrinum</i>	
<i>Mycobacterium porcinum</i>	<i>Mycolicibacterium porcinum</i>	
<i>Mycobacterium senegalense</i>	<i>Mycolicibacterium senegalense</i>	
<i>Mycobacterium septicum</i>	<i>Mycolicibacterium septicum</i>	
<i>Mycobacterium setense</i>	<i>Mycolicibacterium setense</i>	

⇒ Resistência em micobactérias de crescimento rápido

A disponibilidade do sequenciamento completo dos genomas de várias micobactérias permitiu que estudos com mutantes deficientes nos genes de interesse comprovassem o papel das proteínas por eles codificadas, na resistência antimicrobiana intrínseca desse grupo de bactérias. *M. abscessus* ss. *bolletii* pode ser considerada intrinsecamente resistente à claritromicina por expressão do gene *erm* virtualmente em todos os isolados⁴¹. A maioria – cerca de 80% – dos isolados de *M. abscessus* ss. *abscessus* apresenta um gene *erm* funcional⁴¹, e são, portanto, resistentes à claritromicina; entretanto, o restante pode apresentar substituição T28C no gene *erm* ou interrupção da sequência codificante, ambas levando à sensibilidade à claritromicina. A

RNA-metilase codificada por esse gene metila um resíduo de adenina no sítio peptidil-transferase do rRNA 23S.

M. fortuitum apresenta o gene *erm*³⁹, que codifica uma RNA-metilase e é responsável pela resistência intrínseca aos macrolídeos observada nesta espécie. A sensibilidade a essa classe de antimicrobianos pode ocorrer se há mutação GTG-->CTG no códon de iniciação, que resulta na inatividade transcricional do gene⁸⁹.

A catalase-peroxidase KatG, que converte a isoniazida em produto com atividade antimicrobiana, está ausente em *M. abscessus*, o que explica a resistência intrínseca a este composto (Tabela 17).

O gene *eis2* ("enhanced intracellular survival") codifica uma N-acetil-transferase, que leva à resistência de alto nível à capreomicina, com CIMs superiores a 256 mg/L. A mesma proteína está relacionada à resistência de baixo nível à amicacina, com CIM abaixo do ponto de corte de sensibilidade atual de 16 mg/L⁹⁰. Digno de nota, a proteína WhiB7 é necessária para a ativação transcricional dos genes *erm* e *eis2*⁴¹. Por sua vez, a transcrição do gene *whiB7* é induzida mesmo por concentrações subinibitórias de claritromicina; portanto concentrações terapêuticas de claritromicina podem induzir elevação das CIMs tanto para a própria claritromicina por indução da metilase quanto para amicacina⁹¹.

A resistência intrínseca à estreptomicina em *M. abscessus* é determinada pela expressão de *str(3')*, que codifica uma fosfotransferase capaz de modificar apenas este composto⁹².

As espécies do complexo *M. abscessus* expressam uma ADP-ribosiltransferase, codificada pelo gene *arr*, que adiciona uma ribose à rifampicina, levando à resistência intrínseca a este composto⁹⁰.

A resistência intrínseca aos β-lactâmicos em *M. abscessus* é provavelmente decorrente da barreira hidrofóbica representada pelo envoltório celular rico em ácidos micólicos e a baixa afinidade de D,D-transpeptidases aos β-lactâmicos. A expressão dessas D,D-transpeptidases, em vez de D,L-transpeptidases, em *M. abscessus* pode explicar as CIMs para imipenem e ceftazidima mais elevadas neste complexo, diferentemente das demais espécies de micobactérias de crescimento rápido⁹³. A β-lactamase Mab de classe A, produzida por *M. abscessus*, é capaz de degradar eficazmente amoxicilina, ampicilina, clavulanato, sulbactam e tazobactam, mas é inibida pelo avibactam e não degrada imipenem/meropenem⁹⁴. A resistência adquirida aos carbapenê-

micobactérias provavelmente ocorre por mutações espontâneas, diminuindo ainda mais a afinidade das transpeptidases aos β -lactâmicos⁹³ ou por mutação na proteína RshA, um regulador negativo da resposta ao estresse e elevação da temperatura⁹⁵.

O mecanismo pelo qual o complexo *M. abscessus* apresenta resistência intrínseca às fluoroquinolonas ainda não está elucidado. É possível que um sistema de efluxo ainda não caracterizado seja o principal responsável por esse fenômeno⁹³. A resistência adquirida às fluoroquinolonas em micobactérias ocorre por mutações espontâneas no gene *gyrA*, que codifica a subunidade A da DNA girase⁹³.

O etambutol atua inibindo a arabinosil-transferase codificada pelo gene *emB*, responsável pela síntese de arabinogalactana, resultando na inibição da síntese da parede celular. Na maioria absoluta das espécies de micobactérias de crescimento rápido, a exemplo de *M. abscessus*, a resistência intrínseca é explicada pela ocorrência de um resíduo de glutamina na posição 303 (Q303) e um resíduo de metionina na posição 304 (M304) da arabinosil-transferase Emb.

Os elevados níveis de resistência intrínseca à tetraciclina e doxiciclina observados em *M. abscessus* é decorrente da expressão de uma mono-oxigenase indutiva, codificada pelo gene *tetX*, capaz de modificar a tetraciclina e doxiciclina, abolindo a sua capacidade de ligação ao sítio A do ribossomo⁹⁶.

Tabela 17 Genes implicados na resistência antimicrobiana intrínseca em *M. abscessus* e impacto de sua expressão na CIM para esses compostos. Modificado de Luthra *et al.*, 2018⁹⁰

Antimicrobiano	<i>M. abscessus</i> ss. <i>abscessus</i> selvagem (mg/L)	<i>M. abscessus</i> ss. <i>abscessus</i> mutante (mg/L)	Referência
Isoniazida	>512	<i>katG</i> : 32	Luthra <i>et al.</i> , 2018 ⁹⁰
Rifampicina	128	Δ <i>arr</i> : 0,25	Rominski <i>et al.</i> , 2018 ⁹⁷
Capreomicina	>256	Δ <i>eis2</i> : 4	Rominski <i>et al.</i> , 2018 ⁹⁷
Clarithromicina	64	Δ <i>erm41</i> : 0,5	Choi <i>et al.</i> , 2012 ⁹⁸
Kanamicina	8	Δ <i>aac(2')</i> : 0,125	Rominski <i>et al.</i> , 2018 ⁹⁷
Amicacina	4	Δ <i>eis2</i> : 0,25	Rominski <i>et al.</i> , 2018 ⁹⁷
Estreptomicina	32	Δ <i>str(3')</i> : 2	Dal Molin <i>et al.</i> , 2017 ⁹²
Tetraciclina	64	Δ <i>tetX</i> : 4	Rudra <i>et al.</i> , 2018 ⁹⁶
Amoxicilina	>256	Δ <i>bla</i> _{Mab} : 8	Dubeé <i>et al.</i> , 2015 ⁹⁹
Ampicilina	>256	Δ <i>bla</i> _{Mab} : 4	Dubeé <i>et al.</i> , 2015 ⁹⁹
Etambutol	≥ 64	-	Alcaide <i>et al.</i> , 1997 ¹⁰⁰

A resistência adquirida às oxazolidinonas em micobactérias de crescimento rápido ainda é objeto de estudos para elucidação de seus mecanismos. Em

estudo recente de uma coleção de *M. abscessus* resistentes à linezolida, apenas 8,2% apresentavam mutações no rRNA 23S (T2138C, A2271C, C2432T, G3048A), sítio de ligação deste antimicrobiano. O mesmo estudo demonstrou o papel dos genes *lmrs* e *mmpL9*, que codificam bombas de efluxo, na resistência à linezolida¹⁰¹.

A resistência adquirida à amicacina, principal aminoglicosídeo utilizado no tratamento das infecções por micobactérias de crescimento rápido, é mais frequentemente decorrente de mutação no rRNA 16S, usualmente A1408G¹⁰².

A resistência adquirida à tigeciclina é infrequente. Estudo utilizando mutantes obtidos por pressão seletiva com o antimicrobiano *in vitro* evidenciou, por sequenciamento completo dos genomas, que uma mutação pontual no gene MAB_3542c pode estar implicada na resistência a este antimicrobiano. O gene codifica a proteína RshA, um regulador negativo da resposta ao estresse e elevação da temperatura⁹⁵.

⇒ **Resistência antimicrobiana no complexo *M. tuberculosis***

O envoltório celular de *M. tuberculosis* apresenta camada externa espessa de ácidos micólicos, covalentemente ligada à camada de peptidoglicano por uma camada de arabinogalactana e, da mesma forma que nas outras micobactérias, é um dos principais determinantes da resistência intrínseca a antimicrobianos. Esse efeito é maior nos compostos hidrofílicos, mas também é observado, mesmo para antimicrobianos com características hidrofóbicas¹⁰³.

A resistência intrínseca à maioria dos β -lactâmicos, incluindo carbapenênicos, observada em *M. tuberculosis*, é decorrente da expressão de BlaC, uma β -lactamase de classe A, inibida por clavulanato¹⁰⁴.

M. tuberculosis apresenta resistência intrínseca aos macrolídeos pela expressão da RNA-metilase Erm37, que metila os resíduos 2057 a 2059 do rRNA 23S.

M. bovis BCG apresenta resistência intrínseca à pirazinamida por dois mecanismos: deficiência no transporte para o espaço intracelular e não expressão de pirazinamidase, necessária para a ativação da pirazinamida¹⁰⁵.

A contribuição dos sistemas de efluxo na resistência antimicrobiana em *M. tuberculosis* é controversa, mas há evidências de que a expressão desses sistemas varia em função de mudanças ambientais. Por exemplo, as bombas de efluxo, que são capazes de transportar estreptomicina, rifampicina, isonia-

zida, clofazimina, bedaquilina, fluoroquinolonas e etambutol são induzidas por condições ambientais específicas como o ambiente intracelular do macrófago ou meio contendo antimicrobiano.

A resistência antimicrobiana adquirida em *M. tuberculosis* é decorrente de mutações espontâneas, mesmo sem exposição ao antimicrobiano. A exposição ao antimicrobiano contribui para a seleção de mutantes resistentes⁸⁶. A resistência à rifampicina é adquirida por mutações no gene da subunidade beta da RNA-polimerase, na região designada RRDR, sendo a mais frequente a Ser-450-Leu. A resistência à isoniazida pode ocorrer por mutações no gene *katG*, sendo que a mais frequente resulta na substituição Ser-315-Thr, no gene *inhA* ou seu promotor, enquanto a resistência à pirazinamida ocorre por mutações no gene *pncA*, sendo a mais frequente a que resulta nas substituições Asp-12-Ala e Asp, Leu-85-Pro da pirazinamidase (Tabela 18)¹⁰⁶.

As cepas de *M. tuberculosis* resistentes à rifampicina e à isoniazida são classificadas como MDR (resistentes a múltiplos fármacos). Já, cepas classificadas como XDR (extensivamente resistentes aos fármacos) são aquelas resistentes à rifampicina, isoniazida e a pelo menos 3 das seguintes classes: aminoglicosídeos, polipeptídios, fluorquinolonas, tiamidas, cicloserina, ácido para-aminossalicílico (PAS).

A Tabela 19 detalha os genes envolvidos na resistência aos demais antimicrobianos utilizados no tratamento da tuberculose. Mesmo para os antimicrobianos introduzidos mais recentemente em uso clínico para o tratamento da tuberculose, como bedaquilina e pretomanida, há pelo menos dois mecanismos de resistência adquirida distintos para cada um deles.

Tabela 18. Determinantes da resistência adquirida aos antimicrobianos de primeira linha utilizados no esquema 1 de tratamento da tuberculose

Antimicrobiano	Gene ou região promotora	Mecanismo de resistência/alvo ou enzima	Referência
Rifampicina	<i>rpoB</i>	alteração do alvo/subunidade beta da RNA polimerase	Telenti <i>et al.</i> , 1993 ¹⁰⁷
Isoniazida	<i>katG</i>	não conversão da isoniazida em composto com atividade antimicrobiana/catalase-peroxidase	Heym <i>et al.</i> , 1995 ¹⁰⁸
	<i>inhA</i>	alteração do alvo/2-trans-enoil-AcpM redutase	Hazbón <i>et al.</i> , 2006 ¹⁰⁹
	promotor de <i>inhA</i>	superexpressão de <i>inhA</i>	Hazbón <i>et al.</i> , 2006 ¹⁰⁹
Etambutol	<i>embB</i>	alteração do alvo/arabinosil-transferase	Telenti <i>et al.</i> , 1997 ¹¹⁰
Pirazinamida	<i>pncA</i>	não conversão da isoniazida em composto com atividade antimicrobiana/pirazinamidase	Scorpio <i>et al.</i> , 1996 ¹¹¹

Modificado de Gygli *et al.*, 2017⁸⁶

Tabela 19. Determinantes da resistência adquirida aos demais antimicrobianos utilizados no tratamento da tuberculose. Modificado de Gygli *et al.*, 2017⁸⁶

Antimicrobiano	Gene ou região promotora	Mecanismo de resistência/alvo ou enzima	Referência
Etionamida	<i>inhA</i>	alteração do alvo/2-trans-enoil-AcpM redutase	Morlock <i>et al.</i> , 2003 ¹¹²
	promotor de <i>inhA</i>	superexpressão de <i>inhA</i> /2-trans-enoil-AcpM redutase	Morlock <i>et al.</i> , 2003 ¹¹²
	<i>ethA</i>	alteração do alvo/mono-oxigenase dependente de flavina adenina dinucleotídeo	Morlock <i>et al.</i> , 2003 ¹¹²
Fluorquinolonas	<i>gyrA/gyrB</i>	alteração do alvo/subunidades A e B da DNA girase	Malik <i>et al.</i> , 2012 ¹¹³
Estreptomicina	<i>rrs</i>	alteração do alvo/rRNA 16S	Maus <i>et al.</i> , 2005 ¹¹⁴
	<i>rpsL</i>	alteração do alvo/proteína ribossômica (30S) S12	Maus <i>et al.</i> , 2005 ¹¹⁴
Amicacina	Rrs	alteração do alvo/rRNA 16S	Maus <i>et al.</i> , 2005 ¹¹⁴
Kanamicina	Rrs	alteração do alvo/rRNA 16S	Maus <i>et al.</i> , 2005 ¹¹⁴
	promotor de <i>eis</i>	superexpressão de <i>eis</i> 2/N-acetil-transferase	Kambli <i>et al.</i> , 2016 ¹¹⁵
Capreomicina	<i>rrs</i>	alteração do alvo/rRNA 16S	Maus <i>et al.</i> , 2005 ¹¹⁴
	<i>tlyA</i>	não metilação do rRNA16S e do rRNA23S	Monshupanee <i>et al.</i> , 2012 ¹¹⁶
Ácido p-amino salicílico	<i>thyA</i>	timidilato sintase folato dependente/não conversão do PAS em análogo do folato	Minato <i>et al.</i> , 2015 ¹¹⁷
	<i>folC</i>	não conversão do PAS em análogo do folato/di-hidrofolato sintase	Minato <i>et al.</i> , 2015 ¹¹⁷
Cicloserina	<i>Ald</i>	aumento da disponibilidade do substrato da racemase/L-alanina-desidrogenase	Desjardins <i>et al.</i> , 2016 ¹¹⁸
	<i>alr</i>	alteração do alvo/L-alanina-racemase	Desjardins <i>et al.</i> , 2016 ¹¹⁸
	promotor de <i>alr</i>	hiperexpressão do alvo/promotor de L-alanina-racemase	Desjardins <i>et al.</i> , 2016 ¹¹⁸
Bedaquilina	<i>atpE</i>	subunidade C da ATP-sintase/mutação do alvo	Petrella <i>et al.</i> , 2006 ¹¹⁹
	promotor de <i>mmpR</i>	superexpressão da bomba/bomba de efluxo MmpL5	Hartkoorn <i>et al.</i> , 2014 ¹²⁰
Linezolida	<i>rplC</i>	alteração do alvo/proteína ribossômica L3	Zhang <i>et al.</i> , 2016 ¹²¹
	<i>Rrl</i>	alteração do alvo/proteína ribossômica L4	Zhang <i>et al.</i> , 2016 ¹²¹
Delamanida/Pretomanida	<i>Ddn</i>	não conversão em composto com atividade antimicrobiana/nitrorredutase-deazaflavina dependente	Haver <i>et al.</i> , 2015 ¹²²
	<i>fgd1</i>	não conversão em composto com atividade antimicrobiana/glicose-6-fosfato-desidrogenase	Manjunatha <i>et al.</i> , 2006 ⁸⁵
	<i>fbxA/B/C</i>	não conversão em composto com atividade antimicrobiana/deazarriboflavina sintase	Haver <i>et al.</i> , 2015 ¹²²
Clofazimina	promotor de <i>mmpR</i>	hiperexpressão da bomba/bomba de efluxo MmpL5	Hartkoorn <i>et al.</i> , 2014 ¹²⁰

3.4 Referências bibliográficas

1. Partridge SR, Kwong SM, Firth N, Jensen SO. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Reviews*. 2018;31(4):e00088-17, /cmr/31/4/e00088-17.atom.
2. Humeniuk C, Arlet G, Gautier V, Grimont P, Labia R, Philippon A. β -Lactamases of *Kluyvera ascorbata*, Probable Progenitors of Some Plasmid-Encoded CTX-M Types. *AAC*. 2002;46(9):3045–9.
3. Aghapour Z, Gholizadeh P, Ganbarov K, bialvaei AZ, Mahmood SS, Tanomand A, *et al*. Molecular mechanisms related to colistin resistance in *Enterobacteriaceae*. *IDR*. 2019; 12:965–75.
4. Magiorakos A-P, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, *et al*. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*. 2012;18(3):268–81.
5. Organização Mundial da Saúde. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>.
6. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*. 2016;4(2):10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015
7. EUCAST. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing [Internet]. Disponível em: <http://www.eucast.org/>
8. van Dalen R, Peschel A, van Sorge NM. Wall Teichoic Acid in *Staphylococcus aureus* Host Interaction. *Trends in Microbiology*. 2020;12;S0966-842X(20)30144-X
9. Vestergaard M, Frees D, Ingmer H. Antibiotic Resistance and the MRSA Problem. *Microbiology Spectrum*. 2019;7(2).
10. BrCAST [Internet]. Disponível em: <http://brcast.org.br/>
11. Antonelli A, D'Andrea MM, Brenciani A, Galeotti CL, Morroni G, Pollini S, *et al*. Characterization of poxtA, a novel phenicol–oxazolidinone–tetracycline resistance gene from an MRSA of clinical origin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2018;73(7):1763–9.
12. Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N, organizadores. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190424/>
13. Fontana R, Ligozzi M, Pittaluga F, Satta G. Intrinsic Penicillin Resistance in Enterococci. *Microbial Drug Resistance*. 1996;2(2):209–13.

14. Hollenbeck BL, Rice LB. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in *Enterococcus*. Virulence. 15 de agosto de 2012;3(5):421–569.
15. Prater AG, Mehta HH, Kosgei AJ, Miller WR, Tran TT, Arias CA, et al. Environment Shapes the Accessible Daptomycin Resistance Mechanisms in *Enterococcus faecium*. Antimicrob Agents Chemother. 2019;63(10):e00790-19, /aac/63/10/AAC.00790-19.atom.
16. Wang Y, Lv Y, Cai J, Schwarz S, Cui L, Hu Z, et al. A novel gene, *optrA*, that confers transferable resistance to oxazolidinones and phenicols and its presence in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* of human and animal origin. J Antimicrob Chemother. 2015;70(8):2182–90.
17. Moure Z, Lara N, Marín M, Sola-Campoy PJ, Bautista V, Gómez-Bertomeu F, et al. Interregional spread in Spain of linezolid-resistant *Enterococcus* spp. isolates carrying the *optrA* and *poxTA* genes. International Journal of Antimicrobial Agents. 2020;55(6):105977.
18. Teo JWP, Krishnan P, Jureen R, Lin RTP. Detection of an Unusual van Genotype in a Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Hospital Isolate. Journal of Clinical Microbiology. 2011;49(12):4297–8.
19. Palazzo ICV, Pitondo-Silva A, Levy CE, da Costa Darini AL. Changes in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* causing outbreaks in Brazil. Journal of Hospital Infection. setembro de 2011;79(1):70–4.
20. Cherazard R, Epstein M, Doan T-L, Salim T, Bharti S, Smith MA. Antimicrobial Resistant *Streptococcus pneumoniae*: Prevalence, Mechanisms, and Clinical Implications. American Journal of Therapeutics. 2017;24(3):e361–9.
21. Morales-López S, Yepes JA, Prada-Herrera JC, Torres-Jiménez A. Enterobacteria in the 21st century: a review focused on taxonomic changes. J Infect Dev Ctries. 2019;13(04):265–73.
22. Bush K. Past and Present Perspectives on β -Lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2018;62(10):e01076-18, /aac/62/10/e01076-18.atom.
23. Bush K. Proliferation and significance of clinically relevant β -lactamases: β -lactamase overview. Annals of the New York Academy of Sciences. 2013;1277(1):84–90.
24. Pavez M, Neves P, Dropa M, Matté MH, Grinbaum RS, Elmor de Araújo MR, et al. Emergence of carbapenem-resistant *Escherichia coli* producing CMY-2-type AmpC β -lactamase in Brazil. Journal of Medical Microbiology. 2008;57(12):1590–2.
25. Tollentino FM, Polotto M, Nogueira ML, Lincopan N, Neves P, Mamizuka EM, et al. High Prevalence of *bla*_{CTX-M} Extended Spectrum Beta-Lactamase Genes in *Klebsiella pneumoniae* Isolates from a Tertiary Care Hospital: First report of *bla*_{SHV-12'}, *bla*_{SHV-31'}, *bla*_{SHV-38'} and *bla*_{CTX-M-15} in Brazil. Microbial Drug Resistance. 2011;17(1):7–16.

26. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the Versatile β -Lactamases. *CMR*. 2007;20(3):440–58.
27. Lincopan N, McCulloch JA, Reinert C, Cassettari VC, Gales AC, Mamizuka EM. First Isolation of Metallo-beta-Lactamase-Producing Multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a Patient in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005;43(1):516–9.
28. Nicoletti AG, Marcondes MFM, Martins WMBS, Almeida LGP, Nicolás MF, Vasconcelos ATR, et al. Characterization of BKC-1 Class A Carbapenemase from *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(9):5159–64.
29. Pagano M, Barin J, Martins AF, Zavascki AP. High Endemic Rates of OXA-23-Producing Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates Caused by the Persistence of Major Clones in Hospitals in a Brazilian City 5 Years After an Outbreak. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2015;36(7):860–2.
30. Fournier B, Roy PH, Lagrange PH, Philippon A. Chromosomal beta-lactamase genes of *Klebsiella oxytoca* are divided into two main groups, *bla*_{OXY-1} and *bla*_{OXY-2}. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996;40(2):454–9.
31. Granier SA, Leflon-Guibout V, Nicolas-Chanoine M-H, Bush K, Goldstein FW. The Extended-Spectrum K1 β -Lactamase from *Klebsiella oxytoca* SC 10,436 Is a Member of the blaOXY-2 Family of Chromosomal *Klebsiella* Enzymes. *AAC*. 2002;46(6):2056–7.
32. Pavez M, Vieira C, de Araujo MR, Cerda A, de Almeida LM, Lincopan N, et al. Molecular mechanisms of membrane impermeability in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* exposed to imipenem selective pressure. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2016;48(1):78–85.
33. Garneau-Tsodikova S, Labby KJ. Mechanisms of resistance to aminoglycoside antibiotics: overview and perspectives. *Med Chem Commun*. 2016;7(1):11–27.
34. Serio AW, Keepers T, Andrews L, Krause KM. Aminoglycoside Revival: Review of a Historically Important Class of Antimicrobials Undergoing Rejuvenation. *EcoSal Plus*. 2018;8(1). doi: 10.1128/ecosalplus.ESP-0002-2018.
35. Hooper DC, Jacoby GA. Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance: Mechanisms of quinolone resistance. *Ann NY Acad Sci*. 2015;1354(1):12–31.
36. Hooper DC, Jacoby GA. Topoisomerase Inhibitors: Fluoroquinolone Mechanisms of Action and Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016;6(9):a025320.
37. Fonseca ÉL, Freitas F dos S, Vieira VV, Vicente ACP. New *qnr* Gene Cassettes Associated with Superintegron Repeats in *Vibrio cholerae* O1. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(7):1129–31.
38. Park CH, Robicsek A, Jacoby GA, Sahm D, Hooper DC. Prevalence in the United States of *aac*(6′)-Ib-cr Encoding a Ciprofloxacin-Modifying Enzyme. *AAC*. 2006;50(11):3953–5.

39. Li J, Zhang H, Ning J, Sajid A, Cheng G, Yuan Z, et al. The nature and epidemiology of OqxAB, a multidrug efflux pump. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2019;8(1):44.
40. Aires CAM, da Conceição-Neto OC, Tavares e Oliveira TR, Dias CF, Montezzi LF, Picão RC, et al. Emergence of the Plasmid-Mediated mcr-1 Gene in Clinical KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 392 in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(7):e00317-17, e00317-17.
41. Dalmolin TV, Martins AF, Zavascki AP, de Lima-Morales D, Barth AL. Acquisition of the mcr-1 gene by a high-risk clone of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST437/CC258, Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2018;90(2):132–3.
42. Longo LGA, de Sousa VS, Kraychete GB, Justo-da-Silva LH, Rocha JA, Superti SV, et al. Colistin resistance emerges in pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* epidemic clones in Rio de Janeiro, Brazil. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2019;54(5):579–86.
43. Rossi F. The Challenges of Antimicrobial Resistance in Brazil. *Clinical Infectious Diseases*. 2011;52(9):1138–43.
44. Fernandes MR, McCulloch JA, Vianello MA, Moura Q, Pérez-Chaparro PJ, Esposito F, et al. First Report of the Globally Disseminated IncX4 Plasmid Carrying the mcr-1 Gene in a Colistin-Resistant *Escherichia coli* Sequence Type 101 Isolate from a Human Infection in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(10):6415–7.
45. Kieffer N, Nordmann P, Moreno AM, Zanolli Moreno L, Chaby R, Breton A, et al. Genetic and Functional Characterization of an MCR-3-Like Enzyme-Producing *Escherichia coli* Isolate Recovered from Swine in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62(7):e00278-18, /aac/62/7/e00278-18.atom.
46. Fernandes MR, Cerdeira L, Silva MM, Sellera FP, Muñoz M, Junior FG, et al. Novel mcr-5.3 variant in a CTX-M-8-producing *Escherichia coli* ST711 isolated from an infected horse. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2018;1;73(12):3520-3522.
47. Botelho J, Grosso F, Peixe L. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* – Mechanisms, epidemiology and evolution. *Drug Resistance Updates*. 2019;44:100640.
48. Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin T-J, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*. 2019;37(1):177–92.
49. Asif M, Alvi IA, Rehman SU. Insight into *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, global resistance, mechanisms of resistance, treatment options, and alternative modalities. *IDR*. 2018;Volume 11:1249–60.
50. Sánchez MB. Antibiotic resistance in the opportunistic pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *Front Microbiol* 2015;30(6):658. doi: 10.3389/fmicb.2015.00658.
51. Mark BL, Vocadlo DJ, Oliver A. Providing β -lactams a helping hand: targeting the AmpC β -lactamase induction pathway. *Future Microbiology*. 2011;6(12):1415–27.

52. Doi Y, Ghilardi ACR, Adams J, de Oliveira Garcia D, Paterson DL. High Prevalence of Metallo- β -Lactamase and 16S rRNA Methylase Coproduction among Imipenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates in Brazil. AAC. 2007;51(9):3388–90.
53. Wolter DJ, Lister PD. Mechanisms of β -lactam resistance among *Pseudomonas aeruginosa*. Curr Pharm Des. 2013;19(2):209–22.
54. Hong DJ, Bae IK, Jang I-H, Jeong SH, Kang H-K, Lee K. Epidemiology and Characteristics of Metallo- β -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. Infect Chemother. 2015;47(2):81.
55. Yoneyama H, Ocaktan A, Tsuda M, Nakae T. The Role of mex-Gene Products in Antibiotic Extrusion in *Pseudomonas aeruginosa*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 1997;233(3):611–8.
56. Francisco GR, Nora STR, Bueno MFC, da Silva Filho LVRF, de Oliveira Garcia D. Identification of Aminoglycoside-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Producing RmtG 16S rRNA Methyltransferase in a Cystic Fibrosis Patient. Antimicrob Agents Chemother. 2015;59(5):2967–8.
57. Lee J-Y, Chung ES, Na IY, Kim H, Shin D, Ko KS. Development of colistin resistance in pmrA-, phoP-, parR- and cprR-inactivated mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2014;69(11):2966–71.
58. Moffatt JH, Harper M, Boyce JD. Mechanisms of Polymyxin Resistance. In: Li J, Nation RL, Kaye KS, organizadores. Polymyxin Antibiotics: From Laboratory Bench to Bedside. Springer International Publishing; 2019. p. 55–71.
59. Mlynarcik P, Kolar M. Molecular mechanisms of polymyxin resistance and detection of *mcr* genes. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2019;163(1):28–38.
60. Martins AF, Kuchenbecker RS, Pilger KO, Pagano M, Barth AL. High endemic levels of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* among hospitals in southern Brazil. American Journal of Infection Control. 2012;40(2):108–12.
61. Camargo CH, Tiba MR, Saes MR, Vasconcellos FM de, Santos LF dos, Romero EC, et al. Population Structure Analysis of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates from Brazil Reveals Predominance of Clonal Complexes 1, 15, and 79. Antimicrob Agents Chemother. 2016;60(4):2545–7.
62. Moreira MG, Camargo CH, Vasconcellos FM, Barreto LM, Nobre V, Santos SG. Diversity of bla OXA-51 variants and its clonal complexes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in patients with ventilator-associated pneumonia. Journal of Global Antimicrobial Resistance. 2017;9:94–5.
63. Cayô R, Rodrigues-Costa F, Matos AP, Carvalhaes CG, Jové T, Gales AC. Identification of a New Integron Harboring *bla*_{IMP-10} in Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2015;59(6):3687–9.

64. Cayô R, Streling AP, Nodari CS, Matos AP, de Paula Luz A, Dijkshoorn L, *et al.* Occurrence of IMP-1 in non-*baumannii* *Acinetobacter* clinical isolates from Brazil. *Journal of Medical Microbiology*. 2018;67(5):628–30.
65. Deglmann RC, Kobs VC, Oliveira D de, Burgardt P, França PHC de, Pillonetto M. Earliest identification of New Delhi metallo- β -lactamase 1 (NDM-1) in *Acinetobacter pittii* in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2019;52:e20180348.
66. Catel-Ferreira M, Nehmé R, Molle V, Aranda J, Bouffartigues E, Chevalier S, *et al.* Deciphering the Function of the Outer Membrane Protein OprD Homologue of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(7):3826–32.
67. Xu CF, Bilya SR, Xu W. *adeABC* efflux gene in *Acinetobacter baumannii*. *New Microbes and New Infections*. 2019;30:100549.
68. Hamed SM, Elkhatib WF, El-Mahallawy HA, Helmy MM, Ashour MS, Aboshanab KMA. Multiple mechanisms contributing to ciprofloxacin resistance among Gram negative bacteria causing infections to cancer patients. *Sci Rep*. 2018;8(1):12268.
69. Bitar I, Medvecky M, Gelbicova T, Jakubu V, Hrabak J, Zemlickova H, *et al.* Complete Nucleotide Sequences of *mcr-4.3* -Carrying Plasmids in *Acinetobacter baumannii* Sequence Type 345 of Human and Food Origin from the Czech Republic, the First Case in Europe. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019;63(10):e01166-19, /aac/63/10/AAC.01166-19.atom.
70. Ma F, Shen C, Zheng X, Liu Y, Chen H, Zhong L, *et al.* Identification of a Novel Plasmid Carrying *mcr-4.3* in an *Acinetobacter baumannii* Strain in China. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019;63(6):e00133-19, /aac/63/6/AAC.00133-19.atom.
71. Adegoke AA, Stenström TA, Okoh AI. *Stenotrophomonas maltophilia* as an Emerging Ubiquitous Pathogen: Looking Beyond Contemporary Antibiotic Therapy. *Front Microbiol*. 2017;8:2276.
72. Shimizu K, Kikuchi K, Sasaki T, Takahashi N, Ohtsuka M, Ono Y, *et al.* Smqnr, a New Chromosome-Carried Quinolone Resistance Gene in *Stenotrophomonas maltophilia*. *AAC*. 2008;52(10):3823–5.
73. Costa-Lourenço APR da, Barros dos Santos KT, Moreira BM, Fracalanza SEL, Bonelli RR. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: history, molecular mechanisms and epidemiological aspects of an emerging global threat. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2017;48(4):617–28.
74. Tapsall, J. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. World Health Organization. 2001.
75. Unemo M, Shafer WM. Antimicrobial Resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the 21st Century: Past, Evolution, and Future. *Clinical Microbiology Reviews*. 2014;27(3):587–613.
76. Unemo M, del Rio C, Shafer WM. Antimicrobial Resistance Expressed by *Neisseria gonorrhoeae*: A Major Global Public Health Problem in the 21st Century. In: Scheld,

- Hughes, Whitley. Emerging infections. American Society of Microbiology; 2016. p. 213–37.
77. Unemo M, Ballard R, Ison C, Lewis D, Ndowa F, and Peeling R. Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus. World Health Organization. 2013.
 78. Osawa K, Shigemura K, Nukata Y, Kitagawa K, Yamamichi F, Yoshida H, et al. penA, ponA, porB1, and mtrR Mutations and Molecular Epidemiological Typing of *Neisseria gonorrhoeae* with Decreased Susceptibility to Cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(8):e01174-17, e01174-17.
 79. Gianecini R, Oviedo C, Guantay C, Piccoli L, Stafforini G, Galarza P. Prevalence of *bla*_{TEM-220} gene in Penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* strains carrying Toronto/Rio plasmid in Argentina, 2002 – 2011. *BMC Infect Dis*. 2015;15(1):571.
 80. Hu M, Nandi S, Davies C, Nicholas RA. High-Level Chromosomally Mediated Tetracycline Resistance in *Neisseria gonorrhoeae* Results from a Point Mutation in the *rpsJ* Gene Encoding Ribosomal Protein S10 in Combination with the *mtrR* and *penB* Resistance Determinants. *AAC*. 2005;49(10):4327–34.
 81. Belkacem A, Jacquier H, Goubard A, Mougari F, La Ruche G, Patey O, et al. Molecular epidemiology and mechanisms of resistance of azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolated in France during 2013–14. *J Antimicrob Chemother*. 2016;71(9):2471–8.
 82. Grad YH, Kirkcaldy RD, Trees D, Dordel J, Harris SR, Goldstein E, et al. Genomic epidemiology of *Neisseria gonorrhoeae* with reduced susceptibility to cefixime in the USA: a retrospective observational study. *The Lancet Infectious Diseases*. 2014;14(3):220–6.
 83. Gupta RS, Lo B, Son J. Phylogenomics and Comparative Genomic Studies Robustly Support Division of the Genus *Mycobacterium* into an Emended Genus *Mycobacterium* and Four Novel Genera. *Front Microbiol*. 2018;9:67.
 84. Pelegrino K de O, Campos JC, Sampaio SCF, Lezirovitz K, Seco BM, Pereira M de O, et al. *fosI* Is a New Integron-Associated Gene Cassette Encoding Reduced Susceptibility to Fosfomicin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(1):686–8.
 85. Ramón-García S, Otal I, Martín C, Gómez-Lus R, Aínsa JA. Novel Streptomycin Resistance Gene from *Mycobacterium fortuitum*. *AAC*. 2006;50(11):3920–2.
 86. Gygli SM, Borrell S, Trauner A, Gagneux S. Antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: mechanistic and evolutionary perspectives. *FEMS Microbiology Reviews*. 2017;41(3):354–73.
 87. Brennan PJ, Nikaido H. The Envelope of Mycobacteria. *Annu Rev Biochem*. 1995;64(1):29–63.

88. Mailaender C. The MspA porin promotes growth and increases antibiotic susceptibility of both *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology*. 2004;150(4):853–64.
89. Nash KA, Zhang Y, Brown-Elliott BA, Wallace RJ. Molecular basis of intrinsic macrolide resistance in clinical isolates of *Mycobacterium fortuitum*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2005;55(2):170–7.
90. Luthra S, Rominski A, Sander P. The Role of Antibiotic-Target-Modifying and Antibiotic-Modifying Enzymes in *Mycobacterium abscessus* Drug Resistance. *Front Microbiol*. 2018;9:2179.
91. Pryjma M, Burian J, Kuchinski K, Thompson CJ. Antagonism between Front-Line Antibiotics Clarithromycin and Amikacin in the Treatment of *Mycobacterium abscessus* Infections Is Mediated by the *whiB7* Gene. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(11):e01353-17, e01353-17.
92. Dal Molin M, Gut M, Rominski A, Haldimann K, Becker K, Sander P. Molecular Mechanisms of Intrinsic Streptomycin Resistance in *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;62(1):e01427-17.
93. Brown-Elliott BA, Nash KA, Wallace RJ. Antimicrobial Susceptibility Testing, Drug Resistance Mechanisms, and Therapy of Infections with Nontuberculous Mycobacteria. *Clinical Microbiology Reviews*. 2012;25(3):545–82.
94. Soroka D, Dubee V, Soulier-Escrihuela O, Cuinet G, Hugonnet J-E, Gutmann L, *et al*. Characterization of broad-spectrum *Mycobacterium abscessus* class A -lactamase. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2014;69(3):691–6.
95. Ng HF, Tan JL, Zin T, Yap SF, Ngeow YF. A mutation in anti-sigma factor MAB_3542c may be responsible for tigecycline resistance in *Mycobacterium abscessus*. *Journal of Medical Microbiology*. 2018;67(12):1676–81.
96. Rudra P, Hurst-Hess K, Lappierre P, Ghosh P. High Levels of Intrinsic Tetracycline Resistance in *Mycobacterium abscessus* Are Conferred by a Tetracycline-Modifying Monooxygenase. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62(6):e00119-18, /aac/62/6/e00119-18.atom.
97. Rominski A, Roditscheff A, Selchow P, Böttger EC, Sander P. Intrinsic rifamycin resistance of *Mycobacterium abscessus* is mediated by ADP-ribosyltransferase MAB_0591. *J Antimicrob Chemother*. 2017;72(2):376–84.
98. Choi G-E, Shin SJ, Won C-J, Min K-N, Oh T, Hahn M-Y, *et al*. Macrolide Treatment for *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium massiliense* Infection and Inducible Resistance. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;186(9):917–25.
99. Dubee V, Bernut A, Cortes M, Lesne T, Dorchene D, Lefebvre A-L, *et al*. -Lactamase inhibition by avibactam in *Mycobacterium abscessus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2014;dku510.
100. Alcaide F, Pfyffer GE, Telenti A. Role of embB in natural and acquired resistance to ethambutol in mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997;41(10):2270–3.

101. Ye M, Xu L, Zou Y, Li B, Guo Q, Zhang Y, *et al.* Molecular Analysis of Linezolid-Resistant Clinical Isolates of *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;63(2):e01842-18.
102. Wu M, Li B, Guo Q, Xu L, Zou Y, Zhang Y, *et al.* Detection and molecular characterisation of amikacin-resistant *Mycobacterium abscessus* isolated from patients with pulmonary disease. *Journal of Global Antimicrobial Resistance.* 2019;19:188–91.
103. Jarlier V, Nikaido H. Mycobacterial cell wall: Structure and role in natural resistance to antibiotics. *FEMS Microbiology Letters.* 1994;123(1–2):11–8.
104. Wang F, Cassidy C, Sacchetti JC. Crystal Structure and Activity Studies of the *Mycobacterium tuberculosis* β -Lactamase Reveal Its Critical Role in Resistance to β -Lactam Antibiotics. *AAC.* 2006;50(8):2762–71.
105. Raynaud C, Lan elle M-A, Senaratne RH, Draper P, Lan elle G, Daff  M. Mechanisms of pyrazinamide resistance in mycobacteria: importance of lack of uptake in addition to lack of pyrazinamidase activity. *Microbiology.* 1999;145(6):1359–67.
106. Nasiri MJ, Haeili M, Ghazi M, Goudarzi H, Pormohammad A, Imani Fooladi AA, *et al.* New Insights in to the Intrinsic and Acquired Drug Resistance Mechanisms in Mycobacteria. *Front Microbiol.* 2017;8:681.
107. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Matter L, Schopfer K, Bodmer T, *et al.* Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *The Lancet.* 1993;341(8846):647–51.
108. Heym B, Alzari PM, Honore N, Cole ST. Missense mutations in the catalase-peroxidase gene, *katG*, are associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol.* 1995;15(2):235–45.
109. Hazb n MH, Brimacombe M, Bobadilla del Valle M, Cavatore M, Guerrero MI, Varma-Basil M, *et al.* Population Genetics Study of Isoniazid Resistance Mutations and Evolution of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *AAC.* 2006;50(8):2640–9.
110. Telenti A, Philipp WJ, Sreevatsan S, Bernasconi C, Stockbauer KE, Wieles B, *et al.* The *emb* operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. *Nat Med.* 1997;3(5):567–70.
111. Scorpio A, Zhang Y. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nat Med.* 1996;2(6):662–7.
112. Morlock GP, Metchock B, Sikes D, Crawford JT, Cooksey RC. *ethA*, *inhA*, and *katG* Loci of Ethionamide-Resistant Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Isolates. *AAC.* 2003;47(12):3799–805.
113. Malik S, Willby M, Sikes D, Tsodikov OV, Posey JE. New Insights into Fluoroquinolone Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Functional Genetic Analysis of *gyrA* and *gyrB* Mutations. Via LE, organizador. *PLoS ONE.* 2012;7(6):e39754.

114. Maus CE, Plikaytis BB, Shinnick TM. Molecular Analysis of Cross-Resistance to Capreomycin, Kanamycin, Amikacin, and Viomycin in *Mycobacterium tuberculosis*. *AAC*. 2005;49(8):3192–7.
115. Kambli P, Ajbani K, Nikam C, Sadani M, Shetty A, Udwadia Z, *et al*. Correlating *rrs* and *eis* promoter mutations in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* with phenotypic susceptibility levels to the second-line injectables. *International Journal of Mycobacteriology*. 2016;5(1):1–6.
116. Monshupanee T, Johansen SK, Dahlberg AE, Douthwaite S. Capreomycin susceptibility is increased by TlyA-directed 2'-O-methylation on both ribosomal subunits: Capreomycin susceptibility by TlyA methylation. *Molecular Microbiology*. 2012;85(6):1194–203.
117. Minato Y, Thiede JM, Kordus SL, McKlveen EJ, Turman BJ, Baughn AD. *Mycobacterium tuberculosis* Folate Metabolism and the Mechanistic Basis for *para*-Aminosalicylic Acid Susceptibility and Resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(9):5097–106.
118. Desjardins CA, Cohen KA, Munsamy V, Abeel T, Maharaj K, Walker BJ, *et al*. Genomic and functional analyses of *Mycobacterium tuberculosis* strains implicate *ald* in D-cycloserine resistance. *Nat Genet*. 2016;48(5):544–51.
119. Petrella S, Cambau E, Chauffour A, Andries K, Jarlier V, Sougakoff W. Genetic Basis for Natural and Acquired Resistance to the Diarylquinoline R207910 in *Mycobacteria*. *AAC*. agosto de 2006;50(8):2853–6.
120. Hartkoorn RC, Uplekar S, Cole ST. Cross-Resistance between Clofazimine and Bedaquiline through Upregulation of *MmpL5* in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2014;58(5):2979–81.
121. Zhang S, Chen J, Cui P, Shi W, Shi X, Niu H, *et al*. *Mycobacterium tuberculosis* Mutations Associated with Reduced Susceptibility to Linezolid. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(4):2542–4.
122. Haver HL, Chua A, Ghode P, Lakshminarayana SB, Singhal A, Mathema B, *et al*. Mutations in Genes for the F₄₂₀ Biosynthetic Pathway and a Nitroreductase Enzyme Are the Primary Resistance Determinants in Spontaneous *In Vitro*-Selected PA-824-Resistant Mutants of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(9):5316–23.

Capítulo 4:

Teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA)

Doroti de Oliveira Garcia

Nos últimos anos, a ocorrência e disseminação de microrganismos multirresistentes aumentou drasticamente no mundo todo, o que tem levado a comunidade médica e os órgãos governamentais a adotarem medidas mais eficazes no controle e prevenção desses microrganismos.

O primeiro passo para a detecção dessa multirresistência é a realização criteriosa de testes de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA), os quais são utilizados para determinar a sensibilidade total, a sensibilidade diminuída (necessitando o aumento da exposição ao fármaco) ou resistência de microrganismos frente a antimicrobianos *in vitro*. O TSA é de suma importância, pois gera dados que auxiliam a equipe que presta assistência ao paciente no direcionamento da terapia antimicrobiana, e, em alguns casos, podem dar indícios dos possíveis mecanismos de resistência envolvidos. Por meio da realização do TSA são fornecidos dados para que se possa estabelecer o perfil microbiológico/epidemiológico da instituição, o que auxilia na prescrição empírica de antimicrobianos.

O TSA deve ser realizado de acordo com as recomendações de comitês internacionais especializados, tais como o *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* ou o *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)*^{1,2}. No Brasil, de acordo com a Portaria nº 64, de 11 de dezembro de 2018, do Ministério da Saúde, devem ser seguidas as orientações contidas no *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST)*, o qual é uma versão brasileira do documento do EUCAST^{3,4}. Todos os documentos do BrCAST podem ser acessados livremente do [site www.brcast.org.br](http://www.brcast.org.br).

O TSA pode ser desenvolvido através de métodos qualitativos ou quantitativos. Os métodos qualitativos indicam apenas se o microrganismo é sensível, intermediário

(necessitando exposição aumentada ao fármaco) ou resistente a determinado agente antimicrobiano. Por sua vez, os métodos quantitativos, além de gerarem essa mesma informação qualitativa, também determinam a concentração inibitória mínima (CIM), que é a menor concentração (em mg/mL) do agente antimicrobiano capaz de inibir o crescimento bacteriano visível *in vitro*.

A CIM pode ser determinada basicamente por três metodologias diferentes, a saber: diluição em ágar, diluição em caldo ou utilizando fitas de gradiente de concentração do antimicrobiano. Para saber qual metodologia é a mais adequada é preciso fazer uma correta identificação do microrganismo a ser testado, pois a metodologia preferencial pode variar dependendo do microrganismo e do antimicrobiano. Cabe mencionar que existem no mercado diversos meios de cultura e insumos prontos para uso, os quais devem ser utilizados de acordo com as recomendações do fabricante.

Em relação à seleção dos antimicrobianos a serem testados, sugere-se discutir com membros da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) de cada instituição para estabelecer qual o painel mais adequado a ser utilizado, evitando, assim, testar antimicrobianos que não são utilizados na terapêutica clínica daquele local específico. Atenção especial deve ser dada ao sítio de isolamento, pois alguns antimicrobianos só devem ser testados para sítios anatômicos específicos.

4.1 Método qualitativo: disco-difusão

É o método mais difundido e utilizado em rotina laboratorial. Foi primeiramente descrito por Bauer & Kirby (1966)⁵, e o que será detalhado a seguir é baseado no documento do EUCAST/BrCAST³.

O método de disco-difusão, ou Kirby-Bauer, utiliza discos de papel de filtro impregnados com antimicrobianos. Tais discos são colocados em placas de meio de cultura sólido previamente semeadas com um inóculo padrão da bactéria a ser testada. O antimicrobiano se difunde no meio de cultura a partir do disco de forma radial e, dependendo de sua atividade frente à bactéria avaliada, ocorre a formação, ou não, de um halo de inibição ao redor do disco, que é mensurado em milímetros.

A interpretação do diâmetro do halo de inibição é feita conforme os pontos de corte estabelecidos pelos comitês de padronização do TSA, sendo que a bactéria pode ser categorizada como sensível ou resistente ao antimicrobiano. Cabe mencionar que os pontos de corte variam conforme diferentes bactérias e antimicrobianos, sendo que, no BrCAST, existem diversas tabelas de interpretação para os principais grupos de bactérias de importância clínica (*Ordem Enterobacterales*⁶, *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., dentre outros). O meio de

cultura base mais utilizado no TSA por disco-difusão é o ágar Mueller-Hinton (MH) sem aditivos para microrganismos não fastidiosos, ou com suplementos nutricionais para bactérias fastidiosas (nutricionalmente exigentes). O ágar MH-F (MH acrescido de 5% de sangue lisado de cavalo e 1 mL de solução de β -NAD a 20 mg/L) é o meio de cultura preconizado pelo EUCAST/BrCAST para bactérias fastidiosas. Para placas preparadas *in house*, deve-se atentar para a espessura do meio de cultura, que pode afetar os resultados do teste. A espessura deve ser de $4 \pm 0,5$ mm (aproximadamente 25 mL em placas de 90 mm e 70 mL em placas de 150 mm de diâmetro). Detalhes da preparação desse e outros meios estão descritos no Apêndice ao final desse capítulo.

4.1.1 Etapas do Ensaio

A seguir serão descritas as etapas necessárias para a correta realização do teste de disco-difusão. Um vídeo educativo sobre as distintas etapas do ensaio de disco-difusão de acordo com as recomendações do EUCAST/BrCAST estão disponíveis online na plataforma YouTube (https://www.youtube.com/watch?v=iiqQcCQDvu8&list=PLQU_kWRWBld694u9cLr4asinonWSzr-9Rf). Inicialmente, deve-se ter o cuidado de retirar do freezer ou geladeira os discos de antimicrobianos que serão testados com 1h de antecedência. Isso porque eles devem ser utilizados em temperatura ambiente, evitando a condensação que pode levar a uma rápida deterioração de alguns antimicrobianos, como os carbapenêmicos, por exemplo. O armazenamento dos discos deve ser feito de acordo com as instruções do fabricante.

Para o preparo do inóculo bacteriano, deve-se selecionar 4 a 6 colônias morfológicamente semelhantes de um cultivo recente (24h) e suspendê-las com alça bacteriológica esterilizada em 2 a 3 mL de solução salina esterilizada a 0,85%. Com isso, deve-se obter uma suspensão com turvação correspondente à escala 0,5 de McFarland. A turbidez é ajustada com auxílio de um densitômetro, turbidímetro, espectrofotômetro (absorbância de 625 nm, faixa de 0,08 a 0,13) ou visualmente, comparando com o tubo correspondente à escala 0,5 de McFarland (os quais podem ser confeccionados *in house* ou adquiridos comercialmente). Essa turvação corresponde a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC de *Escherichia coli* por mililitro). Para facilitar a comparação visual, recomenda-se a utilização de um fundo branco com linhas pretas.

Algumas exceções a essa preparação de inóculo existem. Para *Streptococcus pneumoniae*, se a suspensão for preparada a partir de cultura em ágar chocolate, a turbidez do inóculo deve ser equivalente ao padrão 1,0 da escala de McFarland.

Para todos os microrganismos a suspensão deve ser utilizada preferencialmente em até 15 minutos e obrigatoriamente em até 60 minutos após o

preparo, garantindo, dessa forma, que a quantidade de bactérias inoculada esteja dentro do padrão estabelecido. Deve-se seguir a regra dos 15-15-15 minutos: usar a suspensão do inóculo dentro de 15 minutos do preparo, aplicar os discos dentro de 15 minutos da semeadura e incubar as placas dentro de 15 minutos da aplicação dos discos.

Para inoculação, umedecer o *swab* de algodão estéril na suspensão bacteriana, girar e pressionar o *swab* na parede interna do tubo para retirar o excesso de líquido antes de efetuar a semeadura nas placas. Entretanto, se a suspensão bacteriana for de bactérias Gram-positivas, não se deve pressionar o *swab* na parede interna do tubo. Semear a suspensão na superfície de placas de ágar Mueller-Hinton, as quais devem estar em temperatura ambiente e sem umidade excessiva. Caso haja excesso de umidade, recomenda-se colocar as placas em estufa com a tampa invertida e parcialmente aberta para a secagem da superfície do meio antes do uso.

A semeadura deve ser realizada em 3 direções, girando a placa em torno de 60°, ou por meio de inoculador automático, de maneira que, ao final desta etapa, toda a superfície do ágar esteja coberta uniformemente pela suspensão bacteriana, o que garantirá um crescimento confluyente. Quando for necessário utilizar mais de uma placa, deve-se introduzir novamente o *swab* no tubo contendo a suspensão e repetir os procedimentos anteriores.

A placa deve ser mantida para secar por 10-15 minutos, em temperatura ambiente. Todo o excesso de inóculo deve ter sido absorvido, antes da aplicação dos discos contendo os antimicrobianos. Com o auxílio de uma pinça previamente esterilizada ou dispensador de discos, os discos são, então, aplicados na superfície da placa. Conforme mencionado anteriormente, a escolha dos antimicrobianos a serem testados deve ser direcionada pelas tabelas do BR-CAST e definida pela equipe de profissionais de cada instituição, dependendo dos antimicrobianos mais frequentemente utilizados.

É importante observar que os discos devem ficar firmemente aderidos à superfície do ágar. Portanto, deve-se utilizar uma pinça metálica para pressioná-los levemente em direção ao ágar. Uma vez aplicados, não devem ser removidos, pois a difusão radial dos antimicrobianos no ágar é instantânea. A quantidade de discos por placa pode variar dependendo do microrganismo e dos antimicrobianos utilizados. Em geral, utilizam-se 12 discos em uma placa de 150 mm de diâmetro e 5 discos em placa de 90 mm de diâmetro. Isso evita que haja sobreposição de halos, o que dificultaria a medida do diâmetro destes.

Após dispensar os discos na superfície do ágar Mueller-Hinton, deve-se inverter as placas e incubar a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ em até 15 minutos. As condições de incubação, em relação à atmosfera de CO_2 e tempo devem seguir as orientações que constam nas tabelas do EUCAST/BrCAST para cada microrganismo.

Após a incubação, e antes de proceder a leitura, deve-se verificar se o crescimento bacteriano na superfície do ágar está confluyente e uniformemente distribuído. Se for observado crescimento muito espesso ou muito escasso, o teste deve ser repetido. A leitura das placas de ágar Mueller-Hinton não suplementadas deve ser feita pelo fundo, com luz refletida contra um fundo escuro. Placas de ágar Mueller-Hinton suplementadas devem ter as tampas removidas e a superfície contendo os discos observada sob luz refletida. Não se deve utilizar luz transmitida (placas observadas contra a luz) ou lupa, exceto quando indicado. A leitura do diâmetro dos halos de inibição deve ser feita com uma régua calibrada ou paquímetro, em milímetros (Figura 1). Se a leitura for realizada com um leitor automático, calibrar com a leitura manual.

Para todos os antimicrobianos, exceto quando indicado, as bordas dos halos devem ser lidas do ponto de completa inibição do crescimento, visto a olho nu, com a placa posicionada a cerca de 30 cm dos olhos. A interpretação dos resultados deve ser feita de acordo com as tabelas de ponto de corte do EUCAST/BrCAST.

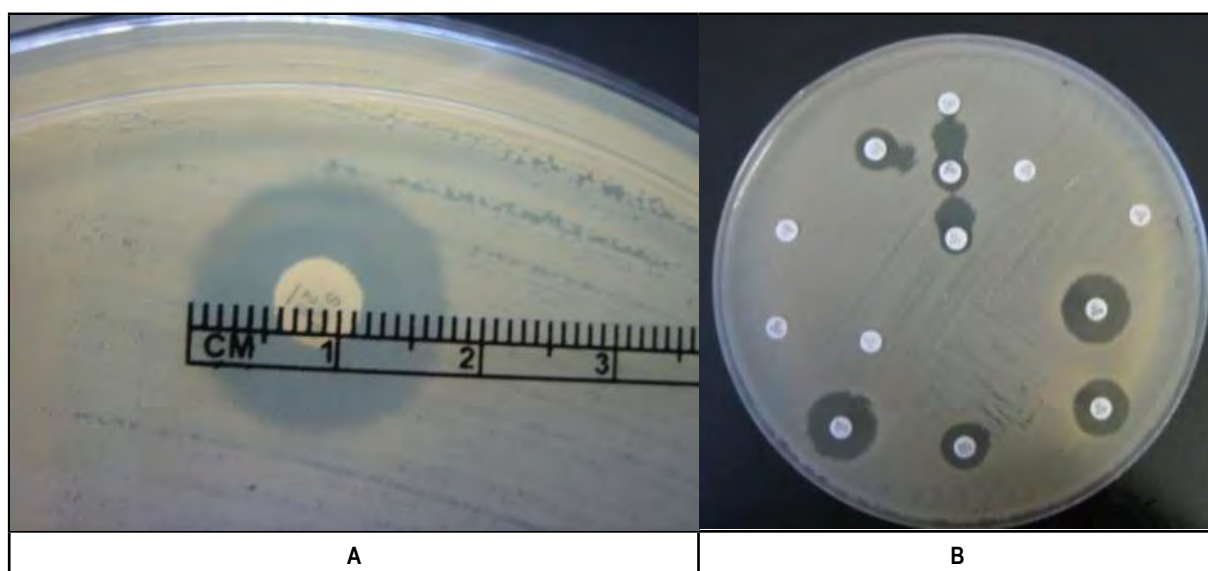
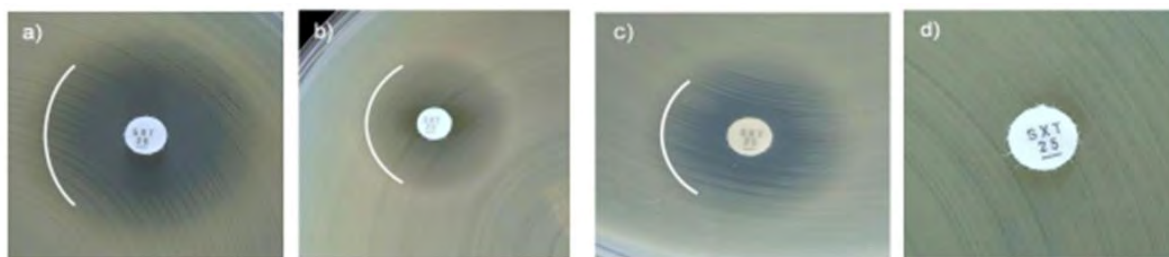


Figura 1. A- Leitura do halo de inibição no teste de disco-difusão; B- placa de teste de disco-difusão

4.1.2 Instruções específicas para a leitura do teste de disco-difusão

A medida dos halos de inibição é uma etapa crítica para garantir a acurácia dos resultados e existem várias situações laboratoriais que podem interferir nessa leitura. Em alguns casos, por exemplo, pode haver a ocorrência de halo duplo ou presença de poucas colônias isoladas dentro do halo de inibição. Nesse caso, é preciso verificar a pureza do isolado bacteriano e, se necessário, deve-se repetir o teste.

Ao testar sulfametoxazol-trimetoprima, pode haver a presença de crescimento reduzido dentro do halo de inibição. Esse fato é devido à presença de altas concentrações de antagonistas (substâncias que inibem a ação do antimicrobiano) no meio, como timina e timidina, e deve ser ignorado. A leitura do diâmetro do halo deve ser feita a partir da borda mais nítida (Figura 2). Já, para ampicilina, ampicilina-sulbactam e amoxicilina-ácido clavulânico testados contra isolados da ordem *Enterobacterales* deve-se ignorar o crescimento de fina película dentro do halo, que ocorre eventualmente em alguns lotes de ágar Mueller-Hinton.



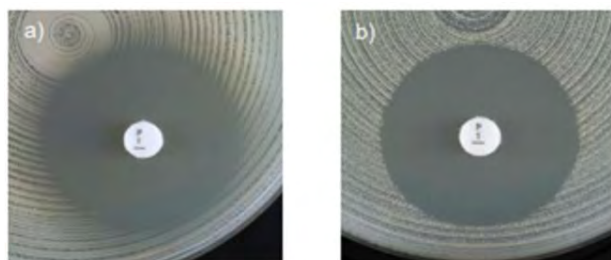
a-c) Um halo externo pode ser visualizado. Reportar como sensível se o diâmetro do halo for ≥ 16 mm lido a partir da marca branca na figura; d) crescimento até a borda do disco E sem sinal de halo de inibição externo. Reportar como resistente. Fonte: EUCAST/BrCAST³.

Figura 2. Exemplos de halos de inibição de *Stenotrophomonas maltophilia* com sulfametoxazol-trimetoprima.

O gênero *Proteus* é reconhecido pela formação de véu (*swarming*) ao crescer em meios de cultura. Tal véu é observado dentro dos halos de inibição quando se realiza o teste de disco-difusão. Nessas situações, deve-se ignorar o véu e realizar a leitura na borda onde ocorrer inibição mais nítida do crescimento bacteriano. Da mesma forma, a zona de hemólise formada por estreptococos hemolíticos deve ser ignorada, considerando-se o halo de inibição de crescimento e não da hemólise. Em geral, bactérias que produzem β -hemólise não apresentam crescimento dentro do halo, enquanto a a-hemólise coincide com o crescimento.

As características das bordas do halo são importantes e devem ser avaliadas com atenção. Por exemplo, na avaliação da sensibilidade de *Staphylococcus aureus* à benzilpenicilina, é preciso examinar a borda do halo com a placa voltada contra a luz (luz transmitida). Isolados com valores de diâmetro do

halo de inibição maiores ou igual aos pontos de corte de sensibilidade, mas com bordas bem definidas, devem ser relatados como resistentes à benzilpenicilina (Figura 3).



a) borda esfumada e diâmetro ≥ 26 mm. Reportar sensível; b) borda bem definida e diâmetro ≥ 26 mm. Reportar resistente. Fonte: EUCAST/BrCAST³

Figura 3: Exemplos de zonas de inibição para *S. aureus* com benzilpenicilina.

Conforme mencionado anteriormente, as medidas dos halos de inibição devem ser realizadas sob luz refletida. Quando utilizada a cefoxitina para detectar resistência à oxacilina (metecilina) em *S. aureus*, é preciso aferir o halo em evidência e visualizar se há presença de colônias dentro do halo, que podem ocorrer devido à cultura mista ou expressão de resistência heterogênea à oxacilina (metecilina). Por sua vez, para a leitura do halo de fosfomicina para *Escherichia coli*, deve-se desconsiderar possíveis colônias internas e realizar a leitura na borda externa do halo.

4.2 Métodos quantitativos

Conforme mencionado anteriormente, os métodos quantitativos englobam diluição em caldo, fitas de gradiente de concentração e diluição em ágar. A diluição em caldo pode ser no formato de microdiluição em placa ou macrodiluição em tubos, sendo que a diferença entre elas está exclusivamente no volume final da metodologia, 100 mL e 1-2 mL, respectivamente. Por questões de praticidade e economia, os laboratórios geralmente realizam microdiluição em caldo.

4.2.1 Microdiluição em caldo

Por meio da exposição da bactéria a concentrações seriadas de antimicrobianos é possível determinar a CIM. Com o valor da CIM também é possível categorizar a bactéria em sensível ou resistente a um determinado antimicrobiano, baseado em tabelas de pontos de corte para cada microrganismo e antimicrobiano, disponibilizadas pelo EUCAST/ BrCAST³.

A microdiluição em caldo é a metodologia indicada pelo EUCAST/BrCAST para determinar a CIM da maioria dos antimicrobianos listados nas tabelas de ponto de corte, com algumas exceções como, por exemplo, a sensibili-

dade à fosfomicina para membros da ordem *Enterobacterales*, *Pseudomonas* spp. e *S. aureus*, a qual deve ser avaliada por ágar diluição. A desvantagem dessa metodologia é a complexidade técnica e a exigência de antimicrobianos em pó, os quais têm, em geral, custo elevado.

⇒ Etapas do Ensaio

A microdiluição em caldo utiliza o caldo Mueller-Hinton cátion ajustado (CMHCA) para bactérias não fastidiosas e o caldo MH cátion ajustado “F” (MH-F) – com suplemento – conforme mencionado anteriormente, para bactérias fastidiosas. Para a realização dessa metodologia são utilizadas microplacas de poliestireno com fundo em “U” (96 poços). Cada poço deverá conter o meio de cultura, a suspensão bacteriana e o antimicrobiano (em concentrações seriadas na placa).

Para tanto, deve-se dispensar o CMHCA (ou o MH-F), comercial ou preparado *in house*, em uma canaleta esterilizada ou placa de Petri descartável esterilizada, aproximadamente 5,0 mL de caldo para cada placa com 96 orifícios a ser testada. A seguir, com uma micropipeta multicanal, dispensar 50 µL de caldo em cada cavidade da microplaca, exceto nas cavidades da coluna 12, nas quais deverão ser dispensados 100 µL de caldo com a concentração de antimicrobiano 2x maior que a máxima (Figura 4). A microplaca não deve ser submetida a quaisquer tratamentos, nem conter aditivos como polissorbato 80 ou outro surfactante. Para maiores detalhes sobre cálculo de concentração de antibióticos, consultar o Apêndice que acompanha esse capítulo.



A – Aspiração do caldo da canaleta pelo uso de micropipeta multicanal – 50 µL nas colunas 1 a 11. B – Transferência do caldo para a microplaca.

Figura 4. Transferência do caldo MH cátion ajustado para a microplaca de 96 orifícios.

Em seguida, deve-se preparar, em um tubo estéril, uma solução do antimicrobiano em CMHCA, com o dobro da maior diluição a ser testada, e distribuir 100 µL em cada orifício da coluna 12. Cabe mencionar que o volume de antimicrobiano a ser testado não pode exceder 5% do volume total do orifício. Portanto, para testar concentrações muito altas, é necessário fazer soluções-mãe mais concentradas.

Partindo da coluna 12 até a coluna 3, deve-se proceder às diluições seriadas. Para isso, deve-se homogeneizar a solução de antimicrobiano com micropipeta multicanal e retirar uma alíquota de 50 µL, a qual será dispensada na cavidade adjacente. Homogeneizar, repetindo o mesmo procedimento até chegar à coluna 3. A coluna 1 deverá conter apenas o caldo, pois será o controle de esterilidade (CE). A coluna 2 conterá apenas a suspensão bacteriana adicionada ao caldo, pois será o controle do crescimento bacteriano (CC).

Após a pipetagem, colocar a tampa na microplaca e identificá-la (nome do antimicrobiano, a data de preparo, etc.). Se não for utilizada imediatamente, deve-se envolver a microplaca com tampa em saco plástico vedando-o com fita adesiva e armazenar em freezer (-20°C ou -70°C) até o momento do uso. Alguns antimicrobianos, como os carbapenêmicos e associações de β-lactâmicos com inibidores de β-lactamases, se degradam mais facilmente e, para esses antimicrobianos, deve-se preparar as microplacas imediatamente antes do uso, ou armazenar por curto período (no mesmo dia da realização do teste) em freezer -70°C.

Para proceder ao teste, retirar as placas contendo as diluições seriadas do antimicrobiano da geladeira e deixar em temperatura ambiente por aproximadamente 1h. Enquanto isso, preparar, em solução salina a 0,85% esterilizada, as suspensões bacterianas a serem testadas bem como as cepas-padrão ATCC ("American Type Culture Collection") de crescimento recente para controle de qualidade da técnica. Deve-se consultar as tabelas de ponto de corte do EUCAST/BrCAST para selecionar a cepa-padrão indicada para o microrganismo que será testado.

A turvação da suspensão bacteriana deve corresponder à do tubo 0,5 da escala McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL) e deve ser preparada conforme descrito para o teste de disco-difusão. Após ajustada a turvação, a suspensão deverá ser diluída (1:100) adicionando em uma canaleta ou placa estéril, 2970 µL de CMHCA e 30 µL da suspensão bacteriana, obtendo-se uma solução com concentração aproximada de 10^6 UFC/mL.

Em seguida, dispensar 50 µL da suspensão diluída, com uma pipeta multicanal, em cada linha, da coluna 2 (sem antimicrobiano) até a coluna 12. Sempre dispensar a cepa padrão ATCC na primeira linha (A), para validação do teste, e as cepas a serem testadas nas demais linhas. Ao final dessa etapa, as concentrações iniciais de antimicrobianos terão sido diluídas 1:2, o que fará com que se alcance as concentrações finais desejadas. A concentração final de bactérias será de 5×10^5 UFC/mL.

Colocar a tampa na microplaca e incubar a $35^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ pelo tempo e atmosfera de adequados a cada microrganismo, de acordo com as tabelas de ponto de corte do EUCAST/BrCAST. Para manter a mesma temperatura de incubação para todas as cepas, não empilhar mais do que quatro placas. Para evitar evaporação excessiva do caldo deve-se colocar a microplaca dentro de recipiente com tampa e colocar algodão ou papel toalha levemente umedecido para se manter a umidade dentro do recipiente.

⇒ **Leitura e interpretação dos resultados:**

O teste de microdiluição será considerado válido quando não houver crescimento na coluna 1 da microplaca, referente ao controle de esterilidade e quando houver crescimento na coluna 2 da microplaca, referente ao controle de crescimento. Além disso, as cepas-controle de qualidade devem apresentar resultados dentro do intervalo de valores estabelecido pelo EUCAST/BrCAST conforme exemplo abaixo. Caso os resultados não cumpram TODOS os requisitos acima descritos, o teste deve ser desconsiderado e repetido, e, se necessário, recorrer à análise de possíveis erros.

Quadro 1: Exemplo de pontos de corte de colistina referentes ao controle de qualidade da microdiluição em caldo frente às cepas padrão *E. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 27853 (EUCAST/BrCAST, 2019).

Antimicrobiano	Microrganismo	Resultado Aceitável (µg/mL)
Colistina	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0,25 – 2,0
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0,5 – 4,0

Na microdiluição, algumas situações são importantes de serem observadas cuidadosamente, tais como as descritas abaixo:

- ⇒ Leitura da CIM para *Neisseria* spp.: corresponde ao orifício onde não for observada a formação do botão de crescimento no fundo do orifício;
- ⇒ Leitura da CIM para *S. pneumoniae*: corresponde ao orifício onde não for observada a formação do botão de crescimento associado à não produção de hemólise;

⇒ *Skipped wells* (orifícios alternados): há o crescimento bacteriano nos orifícios correspondentes a concentrações de antimicrobiano inferiores à CIM; porém, em algumas situações, como a presença de bactérias heterorresistentes, ocorre o crescimento da bactéria em orifícios alternados que contêm concentrações de antimicrobianos superiores à CIM (Figura 5). Ocorre, principalmente, quando testadas as polimixinas ou, como comentado, quando há a presença de heterorresistência. Se ocorrer apenas um orifício saltado, relatar a CIM mais alta. Se ocorrer mais de um orifício saltado, não relatar e repetir o teste.

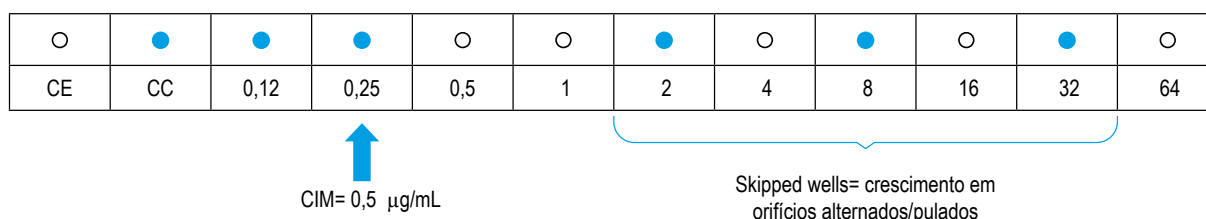


Figura 5: Representação esquemática de uma microdiluição em caldo apresentando *skipped wells*

Para sulfametoxazol/trimetoprima, ler a CIM na menor concentração capaz de inibir aproximadamente 80% do crescimento quando comparado ao orifício de controle de crescimento.

4.2.2 Fitas de gradiente de concentração de antimicrobianos

As fitas de gradiente de concentração representam a forma mais prática de se determinar a CIM em um laboratório de microbiologia clínica, muito embora não possam ser utilizadas para todos os antimicrobianos e tenham custo elevado. Elas correspondem a fitas de material plástico ou papel impregnados com um gradiente de concentração de um determinado antimicrobiano. Tais fitas são aplicadas na superfície dos meios de cultura da mesma forma como é feito com os discos no teste de disco-difusão. Assim, deve-se seguir o que foi descrito acima para o teste de disco-difusão, no que diz respeito ao preparo das suspensões bacterianas e semeadura desse inóculo nas placas de ágar Mueller-Hinton ou MH-F.

Então, com o auxílio de uma pinça esterilizada, aplicar as fitas contendo os antimicrobianos na superfície da placa de ágar previamente semeada com a bactéria em teste. Deve-se atentar para o lado correto de aplicação da fita na superfície do ágar, sempre com o lado da gravação dos símbolos e escalas para cima, pois o antimicrobiano se encontra no verso das gravações na fita, parte que deve ficar em contato com a superfície do ágar. Em placa de 150 x

15 mm, até seis fitas poderão ser aplicadas, mantendo a concentração mais alta na proximidade da borda da placa; quando utilizar fitas contendo apenas um antimicrobiano na extremidade e quando a fita contiver associação de antimicrobianos como um β -lactâmico com um inibidor de β -lactamase (ácido clavulânico ou EDTA), aplicar a fita contendo o antimicrobiano associado voltada para a borda da placa. Em placa de 90 x 15 mm, até duas fitas poderão ser aplicadas, sendo que devem ser dispostas em posição inversa.

Incubar a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, pelo tempo e atmosfera determinado para cada microrganismo, segundo o EUCAST/BrCAST e, em seguida, proceder à leitura e ao registro do valor da CIM. A zona de inibição de crescimento formará uma elipse, sendo que a CIM será o ponto em que o crescimento bacteriano interceptará com a fita contendo o antimicrobiano (Figura 6). Se houver diferença de uma diluição de um lado para outro da fita, considerar a concentração mais alta; se a diferença for igual ou maior que duas diluições, o teste deve ser repetido.

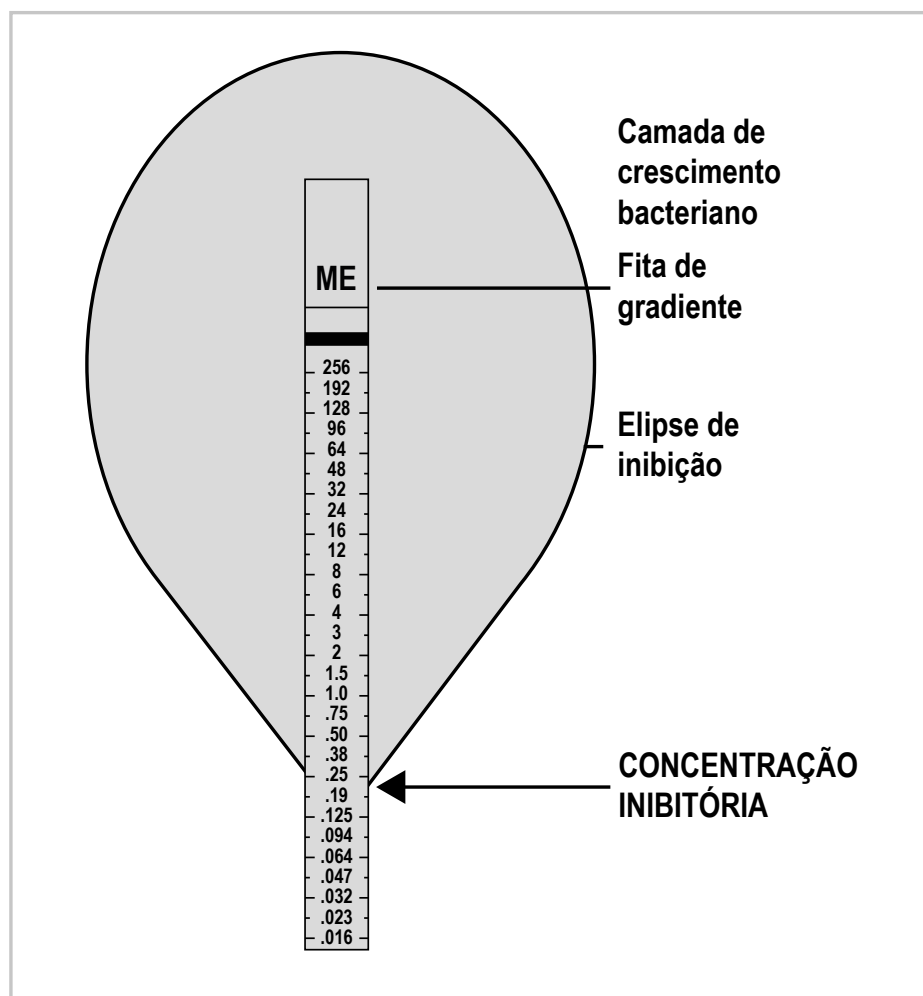


Figura 6. Fita de gradiente de concentração utilizada para a determinação de CIM.

⇒ **Leitura do teste**

Para a leitura do teste, alguns detalhes devem ser observados, tais como os descritos abaixo:

- Ignorar hemólise quando testado com *Streptococcus* spp. Ler no limite do crescimento.
- Ignorar o véu de *Proteus* spp. Ler no limite do crescimento.
- *S. maltophilia*: ignorar a “neblina” na elipse frente ao sulfametoxazol/trimetoprima.
- Pneumococo frente a β -lactâmicos: ler no limite do crescimento. Considerar se houver presença de colônias no interior da elipse.
- Carbapenêmicos e outros antimicrobianos bactericidas: considerar todas as colônias. Ler no limite do crescimento.
- Tigeciclina: ler em 80% de inibição.
- Linezolida: ler em 90% de inibição.
- Glicopeptídeos: elipse estreita, ler no final da elipse.
- Elipse assimétrica: ler no maior valor, se a diferença for > 1 diluição, repetir o teste.

4.2.3 **Ágar diluição**

Essa é uma metodologia relativamente trabalhosa e não utilizada rotineiramente pelos laboratórios de microbiologia clínica. No entanto, conforme comentado anteriormente, é o método recomendado pelo EUCAST/BrCAST para a determinação da resistência à fosfomicina em *Enterobacterales*, *Pseudomonas* spp. e *S. aureus*. Na metodologia de ágar diluição, o antimicrobiano é incorporado ao ágar Mueller-Hinton; portanto, devem ser preparadas várias placas contendo diferentes concentrações do antimicrobiano em cada uma delas. A seguir, o inóculo é aplicado na superfície do ágar por um aplicador de Steers, capaz de transferir de 24 a 96 inóculos em cada placa, dependendo do modelo utilizado. Na base do aplicador, são adicionadas as suspensões bacterianas (uma por orifício) com auxílio de micropipetas. Após, utilizando-se a parte superior do aplicador, é feita a transferência da suspensão para a superfície do ágar, conforme demonstrado nas figuras 7, 8 e 9 a seguir. O inóculo pode também ser aplicado na superfície do ágar utilizando-se micropipetas. As soluções-estoque de antimicrobianos devem ser preparadas de acordo com o descrito para microdiluição em caldo. Recomenda-se utilizar concentrações coerentes com o intervalo de leitura de cada antimicrobiano, de acordo com as tabelas de pontos de corte do EUCAST/BrCAST³.

Com o intuito de se evitar a perda da potência dos antimicrobianos, as placas devem ser preparadas no dia imediatamente anterior ou, no máximo, dois dias antes de seu uso. Para placas contendo antimicrobianos mais sensíveis à degradação, como os carbapenêmicos, é recomendado o preparo no dia de seu uso.

O preparo do ágar Mueller-Hinton deve ser feito de acordo com orientação do fabricante e antes que o mesmo solidifique, alíquotas de 50-60 mL ou 120-140 mL devem ser colocadas em frascos de vidro estéreis os quais são mantidos em banho-maria até que o meio de cultura atinja uma temperatura entre 45–50°C, temperatura ideal para a adição do antimicrobiano. Em seguida, alíquotas das soluções-estoque dos antimicrobianos são adicionadas a cada frasco, sendo que o conteúdo deve ser bem homogeneizado e volumes iguais a 25-30 mL ou 60-70 mL devem ser vertidos em placas de Petri descartáveis de 90 mm e 150 mm de diâmetro, respectivamente, previamente identificadas com a concentração do antimicrobiano. A espessura do meio de cultura, obtida após solidificação, deve ser de $4 \pm 0,5$ mm, o que corresponde, justamente, ao volume adicionado ao de meio de cultura por placa.

As placas devem ser mantidas sobre uma superfície plana até a completa solidificação do meio, sendo posteriormente acondicionadas em sacos plásticos, seladas e armazenadas a 4°C até o momento do uso.

As placas contendo os antimicrobianos devem ser retiradas da refrigeração e mantidas em temperatura ambiente em torno de 15 min. Após o equilíbrio térmico, colocar por alguns instantes em estufa a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ a fim de que qualquer umidade visível evapore da superfície do ágar. As placas devem ser marcadas em sua lateral com um traço marcante, a fim de orientar a aplicação dos inóculos bacterianos (Figura 7).

Preparar a suspensão bacteriana a partir de colônias isoladas em solução salina a 0,85% até atingir a escala 0,5 de McFarland (como para disco-difusão). A partir dessa suspensão bacteriana, deve-se fazer uma diluição 1:10 e adicionar alíquotas de 50 µL nas cavidades do aplicador de Steers.

IMPORTANTE: Sempre utilizar um molde em papel correspondente à placa a ser inoculada com o aplicador de Steers, anotando a numeração dos isolados testados. **SEMPRE** fazer uma marca na base da placa, indicando o início dos inóculos (Figura 7).

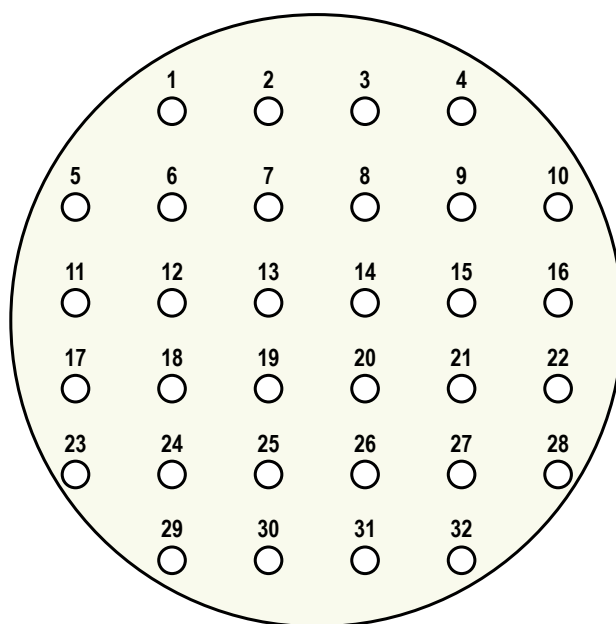


Figura 7. Molde para placas de ágar diluição

A seguir, deve-se introduzir o aplicador de Steers nos orifícios e “carimbar” as placas devidamente identificadas e com a superfície seca (Figura 8).



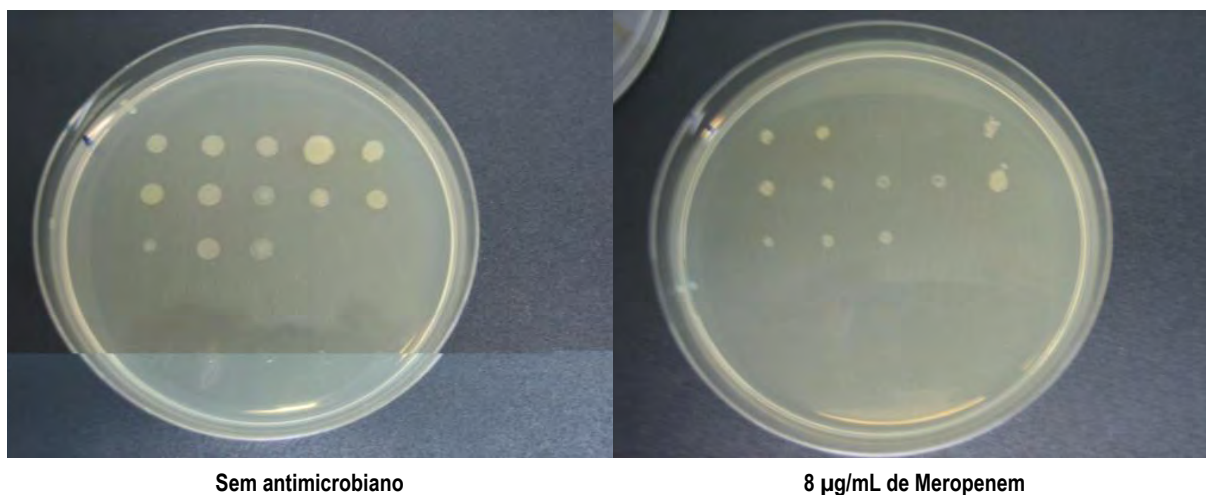
Figura 8. Ágar diluição: Transferência das suspensões bacterianas das cavidades do aplicador de Steers para a placa de ágar MH.

O teste deve ser feito sempre em duplicata. Primeiramente, inocular uma placa sem o agente antimicrobiano para verificar a viabilidade do microrganismo. A seguir, começando-se pela concentração mais baixa, inocular as placas contendo as diferentes concentrações de antimicrobiano. Após a inoculação da placa com a maior concentração, uma segunda placa de controle

do crescimento deve ser inoculada para verificar possível contaminação ou transferência significativa de antimicrobiano.

Após a inoculação, as placas devem permanecer em temperatura ambiente até que a umidade nos pontos de inóculo seja absorvida pelo ágar. A seguir, as placas devem ser invertidas e incubadas, a $35\pm 1^\circ\text{C}$, e atmosfera e tempo de incubação adequados a cada microrganismo, de acordo com as orientações das tabelas de ponto de corte do EUCAST/ BrCAST.

Decorrido o período de incubação, as placas devem ser colocadas sobre uma superfície escura, não refletiva, para a determinação das CIMs. A CIM é definida como sendo a menor concentração do agente antimicrobiano que inibe completamente o crescimento, descartando-se qualquer colônia única ou turvação leve na superfície do meio causada pelo inóculo (Figura 9). Deve-se lembrar de checar primeiro a viabilidade e pureza das cepas na placa sem antimicrobiano, e se as cepas padrão encontram-se dentro dos limites aceitáveis, de acordo com o EUCAST/BrCAST.



Sem antimicrobiano

8 µg/mL de Meropenem

Spot de crescimento em 1 (marca inicial assinalada) = *S. maltophilia* ATCC 13637; 2 = *S. maltophilia* ATCC SMDP92; 3 = *P. aeruginosa* ATCC 27853; 4 = *Escherichia coli* ATCC 25922; 5 a 13 – cepas do Complexo *Burkholderia cepacia*. Figura apenas ilustrativa de uma placa sem antimicrobiano e uma placa com antimicrobiano (8 µg/mL de meropenem).

Figura 9. Ágar diluição.

4.3 Critérios de interpretação de resultados do TSA

Algumas mudanças ocorreram recentemente na definição das categorias sensível, intermediário e resistente, de acordo com as novas orientações do EUCAST/BrCAST. Assim, seguindo esses comitês, as definições vigentes são as seguintes:

- S – Sensível: um microrganismo é considerado “sensível quando existe uma alta probabilidade de sucesso terapêutico usando um regime de dosagem padrão do agente.
- I – Sensível, exposição aumentada: um microrganismo é considerado “sensível, exposição aumentada” quando existe uma alta probabilidade de sucesso terapêutico pela exposição aumentada ao agente antimicrobiano, ajustando o regime de dosagem ou por sua concentração no local da infecção.
- R – Resistente: um microrganismo é considerado “resistente” quando há uma alta probabilidade de falha terapêutica, mesmo quando há aumento da exposição ao antimicrobiano.

Apesar de o termo tradicionalmente descrito como “Intermediário” apresentar uma nova interpretação (“Sensível, exposição aumentada”), a abreviatura nos relatos do TSA continua como “I” sendo que a diferença entre “S” e “I” é a quantidade de antimicrobiano necessária no local da infecção para que seja alcançada uma resposta clínica adequada.

4.3.1 Área de Incerteza Técnica (AIT)

A AIT é outro termo de interpretação recentemente proposto pelo EUCAST para algumas situações nas quais o resultado do TSA (CIM ou diâmetro de halo) não apresenta uma garantia de reprodutibilidade ou de interpretação clínica.

A AIT está definida apenas para algumas combinações antimicrobiano/bactéria e não deve ser relatada ao clínico, exceto em circunstâncias especiais e apenas como parte de uma discussão sobre alternativas terapêuticas em casos difíceis. A seguir, algumas alternativas que podem ser adotadas pelo laboratório quando as leituras de halos de inibição ou CIM coincidirem com as AITs:

- Repetir o teste – apenas quando existe razão para suspeitar de erro técnico.
- Realizar um teste alternativo (CIM, teste para determinar mecanismo de resistência) – relevante quando o teste alternativo é conclusivo (PCR para detectar gene *vanA* ou *vanB* em enterococos, β -lactamase em *H. influenzae*).
- Relatar resultados na faixa AIT como “incerto” – deixar a interpretação em branco e colocar um comentário no laudo, como, por exemplo: “Para essa combinação de antimicrobiano-bactéria, o resultado do TSA não permite descartar incertezas técnicas”.
- Relatar os resultados como “R”. Se houver boas alternativas no resultado do TSA, essa pode ser a opção mais fácil e segura.

4.4 Precauções e cuidados especiais na realização do TSA

Todos os testes de sensibilidade aos antimicrobianos devem ser submetidos rotineiramente a um controle de qualidade de rotina e um controle de qualidade interno para determinação da CIM e dos halos de inibição (disco-difusão). As cepas ATCC a serem utilizadas estão descritas nos documentos de controle de qualidade disponíveis nos sites do EUCAST/BrCAST.

Existem diversas variáveis que podem afetar o resultado de um teste de sensibilidade e que devem, portanto, ser rigorosamente controladas pelo laboratório. A seguir, são descritas as principais:

- Espessura do ágar Mueller-Hinton: a placa de 90 mm deve ter uma espessura de $4 \pm 0,5$ mm. Espessuras menores ou maiores podem levar a falsos resultados de sensibilidade ou resistência, respectivamente.
- Qualidade do meio de cultura utilizado: meios contendo altas concentrações de timina e timidina podem alterar os resultados do teste para sulfametoxazol/trime-toprima. Utilizar sempre meio Mueller-Hinton de boa procedência.
- Concentrações alteradas de Ca^{++} e Mg^{++} no meio de cultura: podem afetar os resultados dos microrganismos frente a aminoglicosídeos e polimixinas.
- Qualidade e armazenamento dos discos: é importante checar sempre se a concentração do antimicrobiano no disco é a recomendada pelo EUCAST/BrCAST. Além disso, a qualidade do papel de filtro utilizada na confecção do disco também pode interferir no resultado, visto que, quando de qualidade ruim, pode apresentar bordas irregulares, ou serem muito finos, prejudicando a perfeita aderência na superfície do ágar. Deve-se respeitar rigorosamente as condições de armazenamento dos discos, para evitar perda de potência do antimicrobiano.
- pH do meio de cultura: deve estar entre 7,2 e 7,4 para garantir resultados de sensibilidade acurados.
- Armazenamento adequado das cepas-padrão: É importante, por exemplo, testar *K. quasipneumoniae* ATCC 700603 (produtora da ESBL SHV-18) frente a β -lactâmicos. O armazenamento inadequado de cepas pode acarretar em perda de plasmídeos e, conseqüente, alteração dos resultados esperados. O ideal é armazenar a -70°C .
- Fitas contendo gradiente de concentração de antimicrobianos, também devem ser submetidas a controle de qualidade, da mesma maneira que os discos, para checar se estão dentro dos padrões estabelecidos pelo EUCAST/ BrCAST.

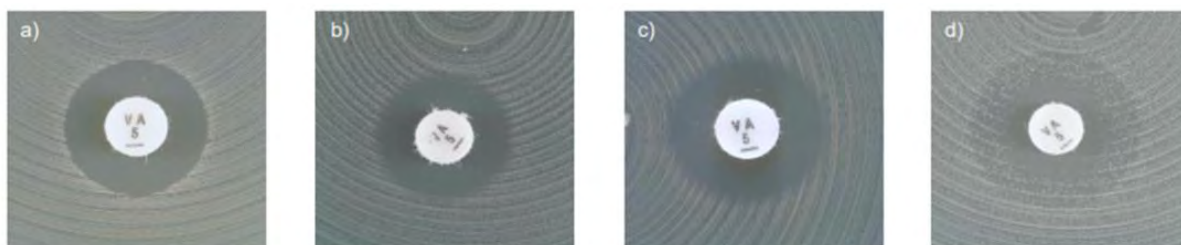
4.5 Pontos críticos

- A correta identificação bacteriana é de fundamental importância para a escolha do método adequado para a realização dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos. Em primeiro lugar porque, dependendo do microrganismo, diferentes

metodologias são indicadas. Em segundo lugar, porque os microrganismos possuem resistência intrínseca a determinados antimicrobianos, o que torna desnecessário testar antimicrobianos aos quais os microrganismos são intrinsecamente resistentes. Consultar sempre as tabelas de ponto de corte do EUCAST/BrCAST para definir a melhor metodologia e a tabela de resistência intrínseca para cada microrganismo.

- Observar sempre, com muita atenção, a concentração do antimicrobiano no disco que é recomendada pelo EUCAST/BrCAST, que diferem em alguns casos com os do CLSI.
- MH-F e caldo MH-F são usados para testar *Streptococcus* spp. (incluindo *S. pneumoniae*), *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* e *C. coli*, *Pasteurella multocida*, *Corynebacterium* spp., *Aerococcus sanguinicola* e *A. urinae*, *Kingella kingae* e outros microrganismos fastidiosos.
- Ágar diluição é o método referência para testar fosfomicina em relação a bactérias da ordem *Enterobacterales*, *Pseudomonas* spp e *Staphylococcus aureus*. A CIM para fosfomicina deve ser determinada na presença de glicose-6-fosfato (25 mg por litro de ágar MH).
- A CIM de colistina/polimixina B deve ser determinada por microdiluição em caldo. O controle de qualidade deve ser realizado com cepa sensível (*E. coli* ATCC 25922 ou *P. aeruginosa* ATCC 27853) e cepa resistente (*E. coli* NCTC 13846 – cepa MCR-1 positiva). Para o preparo das soluções de antimicrobiano usar sempre sulfato de colistina ou sulfato de polimixina B.
- Validar as placas de microdiluição em caldo e ágar diluição realizando o controle de qualidade com as cepas de referência indicadas nas tabelas de ponto de corte do EUCAST/BrCAST para diversos microrganismos. Por exemplo, *Escherichia coli* ATCC 25922 para membros da ordem *Enterobacterales* e *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 para *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp., *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 para *Staphylococcus* spp., *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 para *S. pneumoniae*. Utilizar em todas as placas de microdiluição em caldo.
- A CIM de glicopeptídeos é dependente do método e deve ser determinada por microdiluição em caldo. *S. aureus* com CIM de 2 mg/L para vancomicina estão no limite da distribuição da CIM para população bacteriana do tipo selvagem (isolados sensíveis sem mecanismos de resistência) e pode haver diminuição da resposta clínica. O ponto de corte (resistente) foi diminuído para 2 mg/L para evitar que isolados intermediários (GISA – “Glycopeptide Intermediate *Staphylococcus aureus*”) sejam relatados, já que infecções graves por GISA não são tratáveis com doses altas de vancomicina ou teicoplanina.
- Para determinação da CIM de tigeciclina por microdiluição, o meio deve ser fresco, preparado no dia do uso. Pontos de corte de diâmetro do halo de inibição são validados apenas para *E. coli*.

- Nitrofurantoína: testar apenas para *E. coli* isolada de infecção do trato urinário (ITU) baixa não complicada.
- *S. aureus*, *S. lugdunensis* e *S. saprophyticus* com CIM de oxacilina >2 mg/L são, em sua maioria, resistentes à meticilina pela presença do gene *mecA* ou gene *mecC*. Ocasionalmente, valores de CIM de oxacilina são altos em *S. aureus* na ausência de resistência mediada por gene *mec*. Essas cepas são conhecidas como BORSA (“Borderline Oxacillin-Resistant *S. aureus*”). O EUCAST não recomenda uma triagem sistemática para BORSA. Para estafilococos coagulase negativo, exceto *S. saprophyticus* e *S. lugdunensis*, a CIM de oxacilina em cepas resistentes à meticilina é >0,25 mg/L. *S. aureus* e *S. lugdunensis* com valores de CIM para cefoxitina >4 mg/L e *S. saprophyticus* com valores de CIM para cefoxitina >8 mg/L são resistentes à meticilina (oxacilina) principalmente devido à presença do gene *mecA* ou *mecC*.
- *E. faecium* resistente às penicilinas podem ser considerados resistentes a todos os agentes β -lactâmicos incluindo os carbapenêmicos. Resistência à ampicilina em *E. faecalis* é rara e deve ser confirmada com um método de determinação da CIM.
- Enterococos sensíveis à vancomicina apresentam halos de inibição com bordas bem definidas e não apresentam colônias dentro do halo de inibição (Figura 10). Suspeitar de resistência quando as bordas forem mal definidas (irregulares ou difusas) ou quando houver crescimento de colônias dentro do halo de inibição, mesmo que o diâmetro do halo seja ≥ 12 mm. Os isolados não podem ser relatados como sensíveis antes de 24h de incubação. Resultados duvidosos devem ser confirmados por determinação da CIM e/ou detecção dos genes *van* por PCR.



a) borda bem definida e diâmetro de halo ≥ 12 mm. Reportar sensível; b-d) bordas esfumaçadas ou colônias dentro do halo de inibição. Realizar teste confirmatório com PCR ou reportar resistente, mesmo com diâmetro de halo ≥ 12 mm. Fonte: EUCAST/BrCAST³.

Figura 10. Exemplos de halos de inibição em *Enterococcus* spp. com vancomicina.

- A resistência induzível à clindamicina pode ser detectada pelo antagonismo da atividade da clindamicina por agente macrolídeo. Se o antagonismo não for detectado, reportar o resultado da clindamicina exatamente como encontrado no TSA. Se detectado antagonismo, reportar como resistente à clindamicina e considerar a inclusão do comentário: “A clindamicina ainda pode ser utilizada para tratamento de curta duração ou tratamento de infecções menos graves de pele e tecidos moles porque é improvável haver desenvolvimento de resistência plena durante o tratamento”.

- O teste de triagem com disco de oxacilina 1 µg para *S. pneumoniae* e *H. influenzae* deve ser utilizado para excluir mecanismos de resistência aos β-lactâmicos. Quando o teste de triagem for negativo (halo de inibição ≥ 20 mm), todos os agentes β-lactâmicos para os quais estão disponíveis pontos de corte clínicos, poderão ser relatados como sensíveis sem a realização de testes adicionais. Quando a triagem for positiva (halo de inibição <20 mm), consultar o fluxograma na tabela de ponto de corte do EUCAST/ BrCAST para interpretação.
- Isolados não sensíveis à teicoplanina são raros ou ainda não foram reportados. A identificação e o teste de sensibilidade em isolados não sensíveis devem ser confirmados em centro de referência.
- Um ponto crítico importante em relação à padronização estabelecida pelo EUCAST/BrCAST é que não existem pontos de corte definidos para todos os antimicrobianos, assim como tabelas específicas para todos os microrganismos. Nessa categoria se incluem os bacilos Gram-negativos não fermentadores da glicose outros que não *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. e *Stenotrophomonas maltophilia*, por exemplo. Em todos os casos em que não há pontos de corte estabelecidos, a sugestão é utilizar os pontos de corte baseados em PK/PD [ver tabela específica no site do BrCAST (www.brcast.org) ou do EUCAST (www.eucast.org)], sem relação com espécies. Nesses casos, deve-se utilizar as tabelas de PK/PD que constam no documento EUCAST/ BrCAST, que são baseadas em resultados da CIM, os quais devem ser relatados nos resultados. Quando a CIM for maior que o ponto de corte PK/PD de resistência, desaconselhar o uso do antimicrobiano. Se a CIM for menor ou igual ao ponto de corte PK/PD de sensibilidade, sugerir o uso do antimicrobiano, com precaução. Incluir uma nota no laudo informando que o resultado foi baseado em pontos de corte PK/PD e incluir a dosagem na qual o ponto de corte foi estabelecido.
- E quando não há pontos de corte PK/PD? Os motivos pelos quais os pontos de corte de PK-PD não estão disponíveis podem ser em função de não haver dados para o agente quando ele foi originalmente avaliado ou subsequentemente revisado. A orientação é determinar se a CIM do isolado é consistente com a CIM do tipo selvagem. Acessar o site de distribuição do EUCAST MIC (<https://mic.eucast.org/Eucast2/>) e digitar o nome da espécie ou do agente. Se encontrar uma distribuição que corresponda às espécies relevantes (ou de uma espécie relacionada às espécies em questão) e agente antimicrobiano, poderá decidir se a CIM pertence ou não ao tipo selvagem. Se a CIM for consistente com o tipo selvagem, é possível fazer uma comparação com outras espécies para as quais já exista uma categorização clínica do tipo selvagem (ou seja, pontos de corte já foram determinados). Sugestão no laudo: se a CIM estiver na faixa de tipo selvagem para as espécies ou espécies relacionadas, sugerir que o agente pode ser usado com cautela. Se a CIM estiver acima da faixa do tipo selvagem, o agente não deve ser usado. A CIM também pode ser relatada, embora isso não seja essencial.

4.6 Referências Bibliográficas-

1. Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI. 2015. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standards. Tenth edition. CLSI document M07-A10. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2019. Performance standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 29th edition. Clinical and Laboratory Standards Institute; Wayne, PA, USA.
3. Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, BrCast.2019. Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos. Disponível em: <http://brcast.org.br/documentos/>.
4. EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2019. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, v. 7. Disponível em: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_9.0_Breakpoint_table.pdf.
5. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol 1966; 45(4):493-496.
6. [Adeolu M](#), [Alnajar S](#), [Naushad S](#), [S Gupta R](#). Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. [Int J Syst Evol Microbiol](#).2016; 66:5575-99.

APÊNDICE CAPÍTULO 4

Preparo de Meios de cultura, soluções e afins

1. Preparo *in house* do padrão 0,5 da escala de McFarland

- Adicionar 0,5 mL de solução de BaCl_2 0,048 mol/L (1,175% p/v $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) a 99,5 mL de solução de H_2SO_4 0,18 mol/L (0,36 N) (1% v/v) e misturar bem.
- Conferir a densidade óptica da suspensão em um espectrofotômetro A absorbância em 625 nm deve ser na faixa de 0,08 a 0,13.
- Distribuir a suspensão em tubos de mesmo tamanho e espessura que aqueles utilizados para testar o ajuste do inóculo. Vedar os tubos com papel alumínio.
- Armazenar os padrões vedados no escuro, em temperatura ambiente.
- Agitar os padrões vigorosamente em um agitador (vórtex) imediatamente antes do uso.
- Substituir a escala a cada 6 meses.
- Os padrões adquiridos comercialmente devem ser verificados para assegurar que a absorbância está dentro dos limites aceitáveis.

2. Preparo do meio MH-F

2.1 Preparo da solução estoque de sangue de cavalo lisado a 50%:

- Diluir asépticamente o sangue de cavalo desfibrinado com uma igual quantidade de água deionizada estéril.
- Congelar o sangue a -20°C *overnight* e descongelar. Repetir o ciclo até que as células estejam completamente lisadas (geralmente, 3 ciclos são suficientes, mas, dependendo do caso, podem ser necessários até 7 ciclos).
- Clarificar o sangue lisado de cavalo a 50% por centrifugação e descartar o *pellet*. A obtenção de uma solução clara é fundamental para a leitura do teste. Falha em clarificar a solução pode ser devida à lise inadequada ou centrifugação. A repetição da centrifugação pode melhorar a claridade da solução. A solução estoque pode ser armazenada a -20°C em alíquotas e descongeladas para uso. Não congelar novamente a solução não utilizada.

2.2 Preparo da solução estoque de β -NAD:

- Dissolver β -NAD em água deionizada a uma concentração de 20 mg/mL.
- Esterilizar a solução através de uma membrana de filtro 0.2 μm .
- A solução estoque pode ser armazenada a -20°C em alíquotas e descongelada para uso. Não congelar novamente a solução descongelada.

2.3 Preparo do meio MH-F:

- Preparar e autoclavar o ágar Mueller-Hinton, de acordo com as recomendações do fabricante. Porém, deve-se usar menos 100 mL de água deionizada por litro para permitir a adição de sangue lisado de cavalo. Resfriar o meio a 42 - 45°C .
- Adicionar asépticamente 100 mL de sangue lisado de cavalo a 50% e 1 mL de solução estoque de β -NAD por litro de meio e misturar bem.
- Dispensar o MH-F nas placas de Petri estéreis para obter espessura de $4 \pm 0,5$ mm (aproximadamente 25 mL em placas de 90 mm e 70 mL em placas de 150 mm de diâmetro). Vedar em sacos plásticos hermeticamente fechados e manter em geladeira entre 4 - 8°C .

3. Preparo de Caldo Mueller-Hinton cátion-ajustado

- Ajustes de cátions não são necessários quando o meio recebido do fabricante já contém as concentrações corretas [de 20 a 25 mg de Ca^{++}/L (50 mg/L para daptomicina) e de 10 a 12,5 mg de Mg^{++}/L] de cátions divalentes.
- Para ajuste de Mg^{++} : utilizar cloreto de magnésio a 10 mg/mL. Dissolver 8,36 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ em 100 mL de água ultrapura.
- Para ajuste de Ca^{++} : utilizar cloreto de cálcio a 10 mg/mL. Dissolver 3,68 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ em 100 mL de água ultrapura.
- As soluções de cátions devem ser esterilizadas por filtração em membrana e estocadas a 2 - 8°C .

- Preparar o caldo Mueller-Hinton conforme orientação do fabricante, autoclavar e refrigerar a 2-8°C em um banho de gelo antes da adição dos cátions, caso seja utilizado no mesmo dia. Nota: em meios comerciais desidratados pode haver concentração de Ca⁺⁺ ou Mg⁺⁺. Essa concentração inicial deve ser levada em consideração quando se calcular a quantidade de Ca⁺⁺ ou Mg⁺⁺ a ser adicionada ao meio.
- Adicionar 0,1 mL da solução-estoque refrigerada de Ca⁺⁺ ou Mg⁺⁺ por litro de caldo, para cada incremento desejado de 1 mg/L na concentração final do CMHCA.
- Para meios sem concentração de Ca⁺⁺ ou Mg⁺⁺, adicionar:
 - 2,0 mL da solução 10mg/mL de Ca⁺⁺ → 1000 mL de meio
 - 1,0 ml da solução 10 mg/ ml de Mg⁺⁺ → 1000 mL de meio

4. Preparo do Caldo Mueller-Hinton cátion-ajustado para bactérias fastidiosas:

- Preparar e autoclavar o caldo MH de acordo com as recomendações do fabricante, ou adicionando os cátions em separado quando utilizar CMH sem ajuste de cátions, porém, com menos 100 mL de água deionizada por litro para permitir a adição de sangue lisado de cavalo.
- Resfriar o meio a 42-45°C.
- Adicionar asepticamente 100 mL de sangue lisado de cavalo a 50% e 1 mL de solução estoque de β-NAD por litro de meio e misturar bem.
- Dispensar o CMHCA-F em frascos estéreis com tampa rosca
- Estocar o CMHCA-F a 4-8°C por até 3 meses.

5. Preparo das soluções estoque (mãe) de antimicrobianos:

- Calcular o peso do antibiótico, levando-se em consideração a potência da droga (que consta no rótulo do frasco do antimicrobiano):

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Volume (mL)} \times \text{Concentração } (\mu\text{g/mL})}{\text{Potência } (\mu\text{g/mg})}$$

- Exemplo:

$$\text{Peso (mg)} = \frac{1 \text{ (mL)} \times 10.000 \text{ } (\mu\text{g/mL})}{776 \text{ } (\mu\text{g/mg})} = 12,88 \text{ mg}$$

- Então: Dissolver 12,88 mg do pó do antimicrobiano no solvente indicado e completar o volume para 1 mL com o diluente. Consultar a Tabela de Solventes e Diluentes para o Preparo de Soluções Estoque de Agentes Antimicrobianos.
- Exemplos:

Agente	Solvente	Diluyente
Ceftazidima	Carbonato de sódio	Água
Colistina	Água	Água
Imipenem	Tampão fosfato, pH 7,2. 0,01M	Tampão fosfato, pH 7,2. 0,01M
Fosfomicina	Água	Água
Meropenem	Água	Água
Polimixina B	Água	Água
Vancomicina	Água	Água

5.1. Preparo de solução estoque (mãe) para agentes antimicrobianos com atividade expressa em unidades (U):

- Dividir a atividade expressa no rótulo do frasco do antimicrobiano em U/mg por 10 µg/U, para obter a potência do antimicrobiano.
- Exemplo: Sulfato de Polimixina B = 7760U/mg*
 *ATENÇÃO: a U/mg varia a cada lote do antimicrobiano (SEMPRE consultar o rótulo o antimicrobiano)
 Potência (µg/mg) = 7760/10 = 776µg/mg
- Cálculo do peso do antimicrobiano, levando-se em consideração a potência da droga:

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Volume (mL)} \times \text{Concentração } (\mu\text{g/mL})}{\text{Potência } (\mu\text{g/mg)}}$$

- Exemplo: para preparo de 1 mL de solução 10 mg/mL (10.000 $\mu\text{g/mL}$):

$$\text{Peso (mg)} = \frac{1 \text{ (mL)} \times 10.000 \text{ } (\mu\text{g/mL})}{776 \text{ } (\mu\text{g/mg})} = 12,88 \text{ mg}$$

- Assim, dissolver 12,88 mg de sulfato de polimixina B em 1 mL de água ultrapura estéril. Preparar alíquotas desta solução em microtubos identificados, e conservar em freezer -20°C ou, preferencialmente, a -70°C . Antimicrobianos fotossensíveis, tais como, ciprofloxacina e levofloxacina, devem ser envoltos em papel alumínio antes do congelamento.



Capítulo 5:

Outros testes para detecção fenotípica de resistência bacteriana aos antimicrobianos

Darlan Augusto da Costa Rocha
Jorge Luiz Mello Sampaio

5.1 Testes para a detecção de ESBL

As β -lactamases são enzimas capazes de hidrolisar o anel β -lactâmico presente em alguns compostos químicos (antimicrobianos β -lactâmicos); são amplamente estudadas, principalmente por possuírem uma relação direta com o uso racional de antimicrobianos. Essas enzimas são bioquimicamente classificadas em dois grandes grupos, de acordo com a maneira que hidrolisam o substrato: serino β -lactamases, as quais possuem um resíduo de serina no sítio ativo da enzima e as metalo β -lactamases, que possuem uma ou duas moléculas de íons de zinco em seu sítio-ativo, facilitando a reação hidrolítica¹. Também são classificadas de acordo com a homologia de aminoácidos do sítio-ativo e peso molecular, além da funcionalidade de cada enzima frente a determinado substrato (antimicrobianos β -lactâmicos) ou bloqueador enzimático (exemplo: ácido clavulânico, avibactam e EDTA – Etilenodiamino tetra-acético). São 4 grupos moleculares (A, B, C e D) e 17 subgrupos funcionais (1, 1e, 2a, 2b, 2be, 2br, 2ber, 2c, 2ce, 2d, 2de, 2df, 2e, 2f, 3a, 3b e NI – Não incluídos)²⁻⁴.

A síntese de novos β -lactâmicos nos anos 70-80 foi realizada pela adição de diferentes radicais ao anel β -lactâmico para que pudessem apresentar uma menor afinidade com as enzimas β -lactamases até então caracterizadas, de forma a apresentar uma maior resistência à ação dessas enzimas. A pressão seletiva causada pela utilização clínica, e eventualmente, indiscriminada desses compostos, provavelmente selecionou mutantes com novas enzimas a cada novo β -lactâmico clinicamente disponibilizado, incluindo as oxiiimino-cefalosporinas, amplamente utilizadas para o tratamento de bactérias Gram-negativas em infecções graves nos anos 80. A primeira enzima com capacidade de hidrolisar as oxiiimino-cefalosporinas foi SHV-2, isolada na Alemanha em *Klebsiella ozaenae* e as enzimas com tal capacidade foram denominadas *Extended-spectrum β -lactamases* (β -lactamases de espectro estendido – ESBL).

No Brasil, a primeira publicação relatando a resistência à cefepima em isolados resistentes a ceftazidima, apesar da observação na prática clínica desde 1985 de isolados com resistência a cefalosporinas de terceira geração, foi apenas em 1994⁵.

No entanto, somente em 1997 foi publicado o primeiro estudo com confirmação de 72 isolados de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL⁶. O primeiro trabalho molecular para caracterização de ESBL no Brasil foi apenas nos anos 2000, evidenciando que as ESBLs mais frequentes eram do tipo CTX-M⁷. Um recente trabalho de revisão da resistência em *Enterobacteriales* no Brasil demonstra que a maioria das ESBL no cenário nacional são enzimas dos tipos CTX-M, SHV, TEM, com destaque para a CTX-M-2 que foi a enzima mais frequentemente detectada⁸. Desde o início dos anos 80, as ESBLs foram descritas em vários países, com expansão de clones que produzem essas β -lactamases, bem como por transferência de plasmídeos. *Enterobacteriales* produtoras de ESBL primariamente eram isoladas, em sua grande maioria, em pacientes hospitalizados. Contudo, após os anos 2000 se tornou frequente o isolamento desses microrganismos a partir de pacientes da comunidade^{9,10}.

As ESBL são enzimas capazes de hidrolisar praticamente todas as penicilinas, bem como as oximiino-cefalosporinas: cefalosporinas de segunda, terceira e quarta geração (exemplo: cefuroxima, cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefepima), além de monobactâmicos (ex: aztreonam). Contudo, não hidrolisam carbapenêmicos e cefamicinas (cefexitina e cefotetan) e são bloqueadas por inibidores de β -lactamases, como ácido clavulânico, sulbactam, tazobactam e avibactam. A maioria das ESBLs são classificadas na categoria molecular A e funcional 2be^{1,3,9,11,12}.

A detecção laboratorial de *Enterobacteriales* produtoras de ESBLs é feita por métodos de triagem seguidos por métodos confirmatórios que possuem critérios de interpretação relativamente diferentes a depender da espécie do microrganismo isolado, de acordo com as diretrizes recomendadas pelo EUCAST/BrCAST¹³. Os métodos de triagem podem ser realizados utilizando ceftazidima E ceftriaxona/cefotaxima, ou ainda cefpodoxima isoladamente por disco-difusão, microdiluição em caldo, diluição em ágar ou, ainda, por sistemas automatizados. O teste se baseia na detecção de isolados não sensíveis à dose padrão para esses antimicrobianos. Deve-se ressaltar a importância da utilização de diferentes cefalosporinas de terceira geração para aumentar a sensibilidade do método em *Enterobacteriales*, uma vez que há diferença substancial na Concentração Inibitória Mínima (CIM) para cada isolado, a depender do tipo de enzima produzida¹⁴⁻¹⁸. Já, para *Enterobacteriales* do grupo CESP/MYSPACE (*Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Providencia spp.*, *Hafnia alvei*) o recomendado é a utilização da cefepima, uma vez que a desrepressão da expressão de β -lactamases do tipo AmpC cromossômicas pode ocorrer nessas espécies, um mecanismo comum de resistência a cefalosporinas de terceira geração¹³.

O método de triagem para ESBL por disco-difusão e microdiluição em caldo deve ser interpretado de acordo com os critérios recomendados pelo EUCAST/BrCAST, com os seguintes pontos de corte: CIM >1mg/L para qualquer um dos antimicrobianos (ceftazidima, ceftriaxona/cefotaxima, ou cefpodoxima) e halos de inibição menores que 21 mm para cefotaxima (discos com potência de 5 mg) e cefpodoxima (discos com potência de 10 mg); halos menores que 23 mm para ceftriaxona (discos com potência de 30mg) e halos menores que 22 mm para ceftazidima (discos com potência de 10 mg)¹³.

Equipamentos automatizados também podem ser utilizados para a detecção de ESBL e se baseiam no bloqueio enzimático por ácido clavulânico em combinação com cefalosporinas de terceira e quarta geração (cefepima, cefotaxima e ceftazidima), juntamente com um algoritmo que interpreta a CIM para os antimicrobianos puros. De modo geral, a redução do sinal do crescimento detectado no teste combinado em relação ao sinal detectado no teste com antimicrobiano puro, é indicativo de produção de ESBL. Além disso, o próprio *software* consegue interpretar o valor das CIMs para os diversos β -lactâmicos testados em cada painel e sugerir o provável fenótipo em relação à resistência bacteriana (exemplo: penicilinase, ESBL, AmpCs, entre outros). A sensibilidade dos principais métodos automatizados varia de 83,5% a 98,8%, e a especificidade de 52,2% a 78% quando todas as *Enterobacteriales* são consideradas no cálculo^{17,19-21}.

Uma vez realizada a triagem de isolados resistentes, são executados métodos confirmatórios. A microdiluição em caldo para confirmação de ESBL é realizada utilizando ceftazidima, ceftriaxona e cefepima em diluições seriadas (razão 2) e os mesmos antimicrobianos acrescidos de uma concentração fixa de ácido clavulânico de 4mg/L em todas as diluições. O teste é positivo se houver uma diferença de pelo menos 8 vezes (três diluições) entre a CIM do antimicrobiano puro e do teste realizado com o acréscimo de ácido clavulânico²².

O teste de combinação de discos é realizado utilizando discos de ceftazidima e cefotaxima (discos com potência de 10 mg e 5 mg respectivamente)²³ que são dispostos em placa contendo ágar Mueller-Hinton com um inóculo bacteriano padrão equivalente à escala 0,5 de McFarland. Além desses discos, são adicionados discos dos mesmos antimicrobianos acrescidos de 10 mg de ácido clavulânico. O teste é considerado positivo se houver um aumento no halo de inibição maior ou igual a 5 mm, comparando-se o disco com ácido clavulânico com o disco contendo apenas a cefalosporina^{24,25}.

O método de Jarlier²⁶ ou de disco aproximação, que se baseia no sinergismo entre os discos contendo cefalosporinas de terceira e quarta geração que são dispostos próximos ao disco contendo amoxicilina-ácido clavulânico, também pode ser utiliza-

do para confirmação de ESBL. Em uma placa contendo ágar Mueller-Hinton com um inóculo bacteriano padrão equivalente à escala 0,5 de McFarland são dispostos os discos de cefotaxima, ceftazidima e cefepima (discos com potência de 30 mg) a uma distância de 15 a 30 mm centro a centro em relação ao disco de amoxicilina-ácido clavulânico (20-10 mg). O teste é positivo quando a zona de inibição é aumentada em direção ao disco de amoxicilina-ácido clavulânico²⁷.

Existem no mercado fitas de gradiente de concentração de antimicrobiano específicas para a detecção de ESBL. Elas são uma combinação de cefalosporinas de terceira geração de um lado, e o mesmo antimicrobiano de outro com adição do ácido clavulânico. A interpretação do teste deve ser realizada de acordo com o recomendado pelo fabricante. Da mesma forma que é interpretada a microdiluição em caldo, uma redução de 8 vezes (3 diluições) na CIM do antimicrobiano combinado com ácido clavulânico em relação ao puro, indica a produção de ESBL. Também é indicativo de produção de ESBL o aparecimento de uma zona de inibição no meio da fita (zona fantasma) ou qualquer deformidade nas elipses. É importante ressaltar que esse teste é apenas para confirmar a produção de ESBL e não é recomendado para determinar a CIM¹³.

5.1.1 Métodos alternativos

a) Método tridimensional

Um método alternativo para a detecção de ESBL é o método tridimensional, no qual o microrganismo estudado é semeado na superfície do ágar Mueller-Hinton com turbidez equivalente à escala 0,5 de McFarland, fendas circulares são produzidas no ágar e um inóculo mais denso (10^9 a 10^{10} UFC/mL) é dispensado até o completo preenchimento da fenda. Os discos são dispensados a uma distância de 3 mm das fendas preenchidas com o inóculo bacteriano. Posteriormente, é realizada uma análise por inspeção nas margens da zona de inibição com a fenda contendo o inóculo. A hidrólise do antimicrobiano pela ESBL ocorre de acordo com a difusão pela fenda e a distorção/descontinuidade da zona de inibição e crescimento de colônias isoladas indica presença de ESBL com sensibilidade de 93%²⁸.

b) Métodos colorimétricos

A detecção de ESBL também pode ser feita de maneira rápida (menos de 2 horas) utilizando testes colorimétricos (ESBL NDP), que são baseados na hidrólise do anel β -lactâmico com redução do pH e alteração da cor do meio de vermelho para amarelo, efeito possibilitado pela adição do indicador de pH vermelho de fenol. O primeiro teste foi descrito em 2012 e usa cefotaxima como cefalosporina indicadora. A sensibilidade do método é de 92,6%, en-

quanto a especificidade é de 100%²⁹. Outro método colorimétrico é baseado na utilização de uma cefalosporina cromogênica HMRZ-86 (β Lacta Test) que detecta *Enterobacterales* resistentes às cefalosporinas de terceira geração. O teste apresenta uma sensibilidade e especificidade de 96% e 100%, respectivamente, quando as espécies testadas são *K. pneumoniae* e *E. coli* e o tempo para execução é de apenas 15 minutos³⁰.

c) Meios cromogênicos

Meios de cultura, de modo geral, também podem ser suplementados com cefalosporinas de terceira geração, a exemplo de cefotaxima e ceftazidima para o isolamento de microrganismos produtores de ESBL. Nesse contexto, se destacam os meios cromogênicos por permitirem a identificação presumtiva de microrganismos diferenciando as colônias pela coloração, reduzindo substancialmente o tempo para o isolamento de bactérias produtoras de ESBL, especialmente em rotinas de cultura de vigilância. Há disponibilidade no mercado de algumas marcas de meios cromogênicos para essa finalidade e que apresentam sensibilidade que varia de 74,6% a 94,9% e especificidade entre 94,9% a 96,8%, a depender do fabricante^{31,32}.

5.2 Testes para a detecção de AmpC

As enzimas β -lactamases do tipo AmpC hidrolisam penicilinas, cefalosporinas até terceira geração (não hidrolisam cefalosporinas de quarta geração, a exemplo de cefepima) e hidrolisam cefamicinas (com exceção da enzima ACC-1, uma AmpC mediada por plasmídeo que não hidrolisa cefoxitina) e não são ou são fracamente inibidas pelos bloqueadores de β -lactamases clássicos, a exemplo de ácido clavulânico^{33,34}. As *Enterobacterales* do grupo CESP/MYSPACE (*Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Providencia spp.*, *Hafnia alvei*) possuem genes cromossômicos que codificam para AmpCs e são induzíveis. Nessas bactérias, a desrepressão dos genes ou hiperprodução podem conferir altos níveis de resistência. Já *K. pneumoniae*, *Salmonella spp.* e *P. mirabilis* podem adquirir genes plasmidiais que carregam o gene *ampC*, o que confere as mesmas características observadas em mutantes que possuem genes cromossômicos que estão desreprimidos e levam à hiperprodução dessas enzimas. Os níveis de resistência dependem da expressão ou outros mecanismos de resistência (expressão de bombas de efluxo ou perda de permeabilidade). *Escherichia coli* e *Shigella spp.* podem produzir AmpCs de maneira natural, ou seja, codificadas por cromossomos; contudo, neste caso, a enzima é produzida em um nível mínimo porque os genes promotores de AmpC são considerados “fracos”. Nessas espécies, também pode haver a produção de AmpC por mutação nos promotores de *ampC* ou aquisição de plasmídeos, consequentemente produzindo níveis mais altos

de resistência. É importante ressaltar que a produção de AmpC plasmidial associada a efluxo e/ou perda de permeabilidade pode levar a resistência a carbapenêmicos^{34,35}.

Os primeiros isolados produtores de AmpC codificadas por plasmídeos foram nos anos 80 e têm sido detectadas globalmente, provavelmente por disseminação clonal ou transferência horizontal. As enzimas do tipo AmpC são categorizadas na classe C pela classificação molecular das β -lactamases^{2,3,36}. Dentre as enzimas do tipo AmpC, várias linhagens são provenientes de AmpCs cromossômicas, por exemplo, MIR e ACT de *Enterobacter* spp.; CMY, LAT e FCE de *Citrobacter* spp.; DHA, ACC e FOX de *Morganella morganii*, *Hafnia alveii* e *Aeromonas* spp. respectivamente. Dessas, as mais frequentemente detectadas são as do tipo CMY-2 e DHA³⁴.

Os métodos de detecção de AmpCs se baseiam na resistência às cefalosporinas de terceira geração (ceftazidima ou cefotaxima) e uma cefamicina (cefoxitina), bem como testes de sinergismo com cloxacilina e bloqueio enzimático com ácido fenil-borônico. É importante ressaltar que a utilização da cefoxitina pode ser prejudicada em microrganismos que apresentam deficiência de porinas e que, conseqüentemente, apresentam resistência a esse antimicrobiano^{34,37}.

Os métodos de triagem de AmpCs por disco-difusão e microdiluição em caldo devem ser interpretados de acordo com os critérios recomendados pelo EUCAST/BrCAST, com os seguintes pontos de corte: CIM maior que 8 mg/L e <19 mm de zona de inibição no teste por disco-difusão para cefoxitina (disco com potência de 30 mg), CIM maior que 2 mg/L ou zona de inibição <17 mm para cefotaxima (disco com potência de 5 mg) e CIM maior que 4 mg/L ou zona de inibição <19 mm para ceftazidima (disco com potência de 10 mg). Embora menos específico, para laboratórios que não testam cefoxitina, uma das alternativas é testar cefepima (disco com potência de 30 mg) juntamente com cefotaxima (disco com potência de 5 mg) e/ou ceftazidima (disco com potência de 10 mg) e amoxicilina-ácido clavulânico (disco com potência de 20-10 mg). A sensibilidade à cefalosporina de quarta geração, a resistência às de terceira geração e a não resposta ao bloqueador de ácido clavulânico pode auxiliar na identificação de isolados produtores de AmpC¹³.

Uma alternativa para triagem de isolados produtores de AmpC também pode ser executado utilizando um disco de cefoxitina (disco com potência de 30mg) puro que é disposto em uma placa contendo ágar Mueller-Hinton com um inóculo bacteriano padrão equivalente à escala 0,5 de McFarland. Além do disco contendo apenas o antimicrobiano, deve ser adicionado outro disco do mesmo antimicrobiano acrescido de 200mg de cloxacilina. O teste é considerado positivo se houver um aumento no halo de inibição de, pelo menos, 4 mm comparando-se os halos do disco com e sem cloxacilina. Esse teste apresenta sensibilidade de 95% e especificidade de 95%³⁸.

Alternativamente, podem ser utilizados os antimicrobianos cefoxitina e ceftazidima puros e acrescidos de 400mg de ácido fenil-borônico, um bloqueador enzimático de serino β -lactamases. Um disco de cefoxitina (disco com potência de 30 mg) e um disco de ceftazidima (disco com potência de 10 mg) puro são dispostos em uma placa contendo ágar Mueller Hinton com um inóculo bacteriano padrão equivalente à escala 0,5 de McFarland. Nessa placa são adicionados outros discos dos mesmos antimicrobianos acrescidos de 400 mg de ácido fenilborônico. O teste será considerado positivo quando a diferença entre as zonas de inibição para os discos puro e acrescido do bloqueador apresentar valor maior ou igual a 5mm para os dois antimicrobianos³⁵.

5.3 Testes para detecção de carbapenemases

Os carbapenêmicos são até hoje a classe de antimicrobianos mais utilizada no tratamento das infecções graves causadas por bacilos Gram-negativos em ambiente hospitalar, e, por esse motivo, a disseminação de carbapenemases é, dentro do problema da resistência bacteriana, talvez o tópico mais importante. A produção de carbapenemases é o mecanismo de resistência aos carbapenêmicos mais frequente e mais eficiente em *Enterobacterales* em todo o mundo³⁹. Carbapenemases são β -lactamases capazes de hidrolisar carbapenêmicos, sendo que algumas têm a capacidade de hidrolisar todas as classes de β -lactâmicos atualmente disponíveis. Excetuando as carbapenemases da classe B de Ambler⁴, que possuem uma ou mais moléculas de zinco em seu sítio ativo, as carbapenemases das classes A, C e D possuem um resíduo de serina em seu sítio catalítico.

As carbapenemases são um grupo amplo e diverso de enzimas, sendo as de maior importância clínica na classe A as variantes de KPC – *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase; na classe B as variantes de NDM – New Delhi metallo- β -lactamase, na classe C a CMY-10 e na classe D as variantes de OXA. Essas enzimas usualmente apresentam seus determinantes genéticos localizados em transposons e plasmídeos, o que facilita a sua disseminação⁴⁰. As carbapenemases diferem amplamente quanto à sua efetividade na hidrólise de carbapenêmicos; portanto, sua detecção no laboratório de rotina de microbiologia por métodos fenotípicos representa um desafio. Além da grande variação dos coeficientes de hidrólise, há variabilidade da expressão em diferentes microrganismos e contextos genéticos^{41,42} e, conseqüentemente, o fenótipo de resistência pode ser de resistência a todos os carbapenêmicos e cefalosporinas, observado frequentemente nas cepas produtoras de KPC, ou resistência a carbapenêmicos e sensibilidade às cefalosporinas observada em cepas produtoras de variantes de OXA-48.

Apesar da grande importância epidemiológica, a detecção de carbapenemases não é necessária para a categorização de um isolado como sensível dose padrão (S), sen-

sível aumentando exposição (I) ou resistente (R) segundo as normas do EUCAST/BrCAST, bastando a interpretação do diâmetro do halo de inibição e Concentração Inibitória Mínima (CIM), segundo os critérios interpretativos vigentes.

A detecção de carbapenemases, além da importância epidemiológica para implementação de precauções de contato, é importante para orientar a prescrição de antimicrobianos enquanto o resultado do antibiograma não está disponível. Com a aprovação para uso clínico de antimicrobianos associados aos novos inibidores de β -lactamases como ceftazidima-avibactam, é importante reconhecer a classe da carbapenemase produzida pelo isolado bacteriano, uma vez que essa combinação é ativa contra a maioria dos isolados produtores de KPC, OXA-48, mas não é ativo contra isolados produtores de metalo- β -lactamases.

Há diversos métodos para detecção de carbapenemases descritos na literatura, que serão detalhados nesse capítulo. Os métodos moleculares são considerados o padrão ouro para detecção de genes de carbapenemases conhecidos; porém, a detecção do gene codificador da carbapenemase não garante a sua expressão. Por outro lado, os testes fenotípicos têm menor custo e permitem a identificação presuntiva dos grupos de carbapenemases. Todos os laboratórios clínicos no Brasil devem seguir as normas do EUCAST/BrCAST para detecção de mecanismos de resistência, incluindo a detecção de carbapenemases; entretanto, no documento, há vários testes recomendados e o laboratório deve avaliar e implementar aqueles com melhor relação custo-efetividade e que melhor se adaptem à sua rotina e epidemiologia. O documento intitulado “Orientações do EUCAST para a detecção de mecanismos de resistência e resistências específicas de importância clínica e/ou epidemiológica” descreve os métodos a serem utilizados nos laboratórios clínicos no Brasil e está disponível em <http://brcast.org.br/documentos/>¹³.

5.3.1 Triagem da produção e caracterização de carbapenemases em *Enterobacteriales* pelo método de disco-difusão

Segundo o EUCAST/BrCAST, os dois carbapenêmicos que podem ser utilizados para triagem de isolados produtores de carbapenemases são o ertapenem e o meropenem. O ertapenem tem a vantagem de o ponto de corte clínico para a categoria resistente no método de disco-difusão (< 25 mm) ser o mesmo utilizado para triagem, ou seja, a resistência a este composto é considerada uma triagem positiva para a produção de carbapenemases (Tabela 1); entretanto, o ertapenem tem baixa especificidade em *Enterobacter* spp. e *Klebsiella aerogenes*, pela ocorrência significativa de isolados desses gênero e espécie produtores de ESBL e simultaneamente com alterações de porinas⁴³. O meropenem é o substrato que apresenta a melhor combinação de especificidade e sensibilidade, com 100% de sensibilidade^{43,44}. O uso do disco de ceftazidima-avibactam como parte da triagem de *Enterobacteriales*

produtoras de carbapenemases pode ser útil, pois cepas que expressam variantes de KPC sensíveis ao meropenem têm capacidade de hidrolisar meropenem abolida ou reduzida e usualmente apresentam níveis elevados de resistência à ceftazidima-avibactam⁴⁵.

Tabela 1. Pontos de corte clínicos e para triagem de *Enterobacterales* produtoras de carbapenemases (de acordo com a metodologia do EUCAST)²³.

Carbapenêmico	CIM (mg/L)		Diâmetro do halo de inibição (mm) com discos de 10 µg	
	Valor de corte S/I	Valor de corte para triagem	Valor de corte S/I	Valor de corte para triagem
Meropenem ^a	≤2	>0,12	≥22	<28 ^b
Ertapenem ^c	≤0,5	>0,12	≥25	<25

^aMelhor equilíbrio entre sensibilidade e especificidade

^bIsolados com 25-27 mm só necessitam ser investigados para produção de carbapenemases se forem resistentes à piperacilina-tazobactam e/ou temocilina (temocilina contribui mais para especificidade). A confirmação de carbapenemases é sempre necessária se o diâmetro do halo para meropenem for < 25 mm.

^cElevada sensibilidade, mas baixa especificidade. Pode ser usado como um agente de triagem alternativo, mas isolados com ESBL e AmpC podem apresentar resistência mesmo sem ter carbapenemase.

Retirado do documento do BrCAST Orientações do EUCAST para a detecção de mecanismos de resistência e resistências específicas de importância clínica e/ou epidemiológica.

5.3.2 Identificação fenotípica de carbapenemases por disco-difusão com inibidores adicionados aos discos de sensibilidade

⇒ Discos combinados

O teste fundamenta-se no método de disco-difusão, mas com a adição de uma ou mais soluções inibidoras a discos de carbapenêmicos. O diâmetro do halo de inibição obtido com e sem inibidores é aferido e havendo aumento de 5mm ou mais, comparado ao disco sem inibidores, o teste é considerado positivo. Os ácidos aminofenilborônico (AAFB) e fenilborônico (AFB) inibem carbapenemases de classe A, sendo as principais enzimas desta classe as variantes de KPC. A combinação com melhor desempenho para detecção de KPCs é meropenem com AFB, pois apresenta 100% sensibilidade e 97,6% de especificidade (46). A cloxacilina é um inibidor de AmpCs, utilizado para diferenciar essas enzimas das KPCs, pois as AmpCs podem conferir resistência aos carbapenêmicos quando há perda de porina associada. As KPCs não são inibidas pela cloxacilina. As enzimas da classe B de Ambler, são inibidas por quelantes de metais, a exemplo de EDTA, ácido 2-mercaptopropiônico, ácido mercaptoacético e ácido dipicolínico (DPA). Esses compostos são capazes de quelar o zinco presente no sítio catalítico das metalo-β-lactamases⁴⁷. O grupo de enzimas mais importante dessa classe é o das NDMs. Apesar de não haver um estudo na literatura indexada comparando a eficiência desses inibidores na inativação das diferentes variantes de NDM, o estudo de Giske e colaboradores evidenciou que o DPA tem maior especificidade que o EDTA;

portanto se for utilizado o EDTA é recomendável que seja feita a confirmação por método molecular⁴⁸.

A Tabela 2 detalha a quantidade de inibidor por disco de meropenem de 10 µg e modo de preparo das soluções. Por exemplo, para o preparo de 1 mL de solução de ácido dipicolínico, deve-se pesar 100 mg do ácido e dissolver em 1 mL de dimetilsulfóxido. Um volume de 10 µL deve ser adicionado a cada disco em até 15 minutos após a aplicação dos discos de meropenem sobre a superfície do ágar Mueller-Hinton. No caso de combinação de inibidores, como DPA e AFB, adicionar 10 µL de cada solução. A Tabela 3 detalha o perfil obtido com os principais grupos de carbapenemases. Em caso de ausência de aumento do halo após a adição dos inibidores e resistência à temocilina, o perfil é compatível com *OXA-48-like*, sendo recomendável a confirmação por PCR. Até o momento não há relato de caso autóctone de *OXA-48* no Brasil, sendo *OXA-370* a variante descrita e detectada no Brasil até a data de preparo desse texto⁴⁹⁻⁵¹.

Tabela 2. Soluções de inibidores a serem aplicadas aos discos de meropenem²³

Inibidor	Quantidade de inibidor por disco	Solução de inibidor
DPA	1000 µg	100 mg/mL em DMSO
AFB	400 µg	40 mg/mL em água e DMSO 1/1
AAFB	600 µg	60 mg/mL em água
CLOX	750 µg	75 mg/mL em água
EDTA	730 µg	0,1 M em água; pH 7,4

Nota: O volume de cada solução a ser aplicado ao disco é de 10 µL.

Abreviaturas: DPA = ácido dipicolínico, DMSO = dimetilsulfóxido, AFB = ácido fenilborônico, AAFB = ácido aminofenilborônico, CLOX = cloxacilina, EDTA = ácido etilendiamino tetra-acético.

Tabela 3. Testes fenotípicos para diferenciação de carbapenemases em *Enterobacterales* com diâmetro do halo de inibição < 28 mm ou CIM < 0,125 mg/L para meropenem, segundo o EUCAST/BrCAST²³

Grupo de β -lactamase	Sinergismo observado com aumento ≥ 5 mm do halo de inibição com disco de meropenem (10 μ g)				CIM de temocilina >32 mg/L ou diâmetro do halo de inibição <11 mm
	ADP/EDTA	AAFB/AFB	DPA/EDTA AAFB/AFB	CLOX	
MBL	+	-	-	-	Variável ^a
KPC	-	+	-	-	Variável ^a
MBL + KPC ^b	Variável	Variável	+	-	Variável ^a
OXA-48-like	-	-	-	-	Sim
AmpC + perda de porina	-	+	-	+	Variável ^a
ESBL + perda de porina	-	-	-	-	Não

Modificado do arquivo original disponível em: www.brkast.org.br

Abreviaturas: MBL = metalo- β -lactamase, KPC = Carbapenemase de *Klebsiella pneumoniae*, DPA = ácido dipicolínico, EDTA = ácido etilendiamino tetra-acético, AAFB = ácido aminofenilborônico, AFB = ácido fenilborônico, CLOX = cloxacilina.

O teste é considerado positivo se houver aumento do diâmetro do halo de ≥ 5 mm quando comparado ao halo obtido com o disco sem inibidor.

^aO resultado do teste de sensibilidade à temocilina só deve ser considerado se caso for observado nenhum sinergismo com DPA/EDTA, AAFB/AFB, CLX e ADP+AAFB/AFB, a fim de diferenciar entre ESBL + perda de porinas e enzimas OXA-48-like. Quando outras enzimas estão presentes, a sensibilidade é variável e não fornece qualquer indicação adicional da β -lactamase presente.

^bHá um relato que suporta o uso de comprimidos comerciais contendo dois inibidores (DPA ou EDTA mais AAFB ou AFB)⁴⁸, mas ainda faltam estudos multicêntricos ou múltiplos estudos de um único centro. No Brasil, um número crescente de publicações tem relatado a ocorrência de co-produção de NDM e KPC em *Enterobacterales*.

⇒ Método de inativação de carbapenêmico (CIM) e variantes eCIM, mCIM, blood-mCIM, rCIM e sCIM

O teste foi originalmente descrito por van der Zwaluw e colaboradores⁵² e baseia-se no método de disco-difusão utilizando a cepa de referência *Escherichia coli* ATCC 25922 (NCTC 12241, CIP 76.24, DSM 1103, CCUG 17620, CECT 434), sensível aos carbapenêmicos, e disco de meropenem previamente incubado por duas horas em suspensão do isolado a ser testado quanto à produção de carbapenemases. O inóculo bacteriano obtido de ágar Mueller-Hinton ou ágar sangue, equivalente a uma alça cheia de 10 μ L é suspenso em 400 μ L de água, um disco de meropenem de 10 μ g é adicionado a essa suspensão e a seguir o tubo é incubado a 35°C. Após duas horas, o disco é removido e aplicado sobre a superfície de ágar Mueller-Hinton inoculado com suspensão de *E. coli* ATCC 25922 com turbidez equivalente ao padrão 0,5 da escala de McFarland. Após seis horas de incubação, a ausência de halo de inibição ao redor do disco, incubado na suspensão bacteriana, indica produção de carbapenemase. O teste, tal como descrito inicialmente, apresenta sensibilidade de 50 a 90% para OXA-48-like⁵³⁻⁵⁵, tendo sido proposto por Pierce e colaboradores o mCIM⁵⁵. O teste mCIM difere do método original pelo fato de que a suspensão bacteriana é preparada em caldo TSB, após a adição do disco de meropenem é realizada incubação por 4 horas, e há critérios de diâmetro de halo de inibição definidos. Diâmetros de 6 a 15 são

considerados positivos para carbapenemase, 16 a 18 mm são considerados indeterminados e aqueles ≥ 19 mm são considerados negativos. Quando há colônias dentro do halo de inibição, são considerados positivos diâmetros ≤ 18 mm e indeterminados aqueles ≥ 19 mm. Na publicação original, o mCIM apresentou a mesma especificidade de 100% observada no teste original CIM. A sensibilidade do mCIM – 93% – foi superior àquela de 82% observada para o CIM⁵⁵.

Considerando que a caracterização precoce de produtores de metalo- β -lactamases é uma ferramenta importante para guiar o uso de ceftazidima-avibactam, foi proposto o eCIM⁵⁶. Esta modificação do método CIM utiliza EDTA para bloquear a degradação do meropenem por metalo- β -lactamases e segundo os autores tem 100% de especificidade e sensibilidade. No método eCIM, dois tubos contendo 2 mL de caldo TSB, um deles contendo EDTA 5 mM, são inoculados com massa equivalente a uma alça de 1 μ L.

Após 4 horas de incubação, os dois discos incubados nas suspensões são transferidos para a superfície do ágar Mueller-Hinton inoculado com a suspensão de *E. coli* ATCC 25922 com turbidez equivalente ao padrão 0,5 da escala de McFarland. Após 6 horas de incubação, os halos de inibição obtidos com os discos tratados são aferidos e comparados. Aumento ≥ 5 mm no halo obtido com o disco incubado na presença de EDTA 5 mM, comparado com o diâmetro do halo obtido com o disco tratado sem EDTA indica presença de carbapenemases. Diferenças ≤ 4 mm indicam negatividade para a detecção de metalo- β -lactamase. A principal limitação do teste é que nas cepas co-produtoras de KPC e NDM o teste se apresenta negativo levando a um diagnóstico incorreto. A sensibilidade e especificidade de 100% são, portanto, decorrentes da amostragem sem co-produtores de NDM e KPC ou serina e metalo- β -lactase. O teste tem valor, portanto nos casos positivos para metalo- β -lactamases, mas em caso de negatividade do bloqueio com EDTA não é possível afastar a possibilidade de que haja co-produção de KPC e NDM.

Como o tempo de leitura do método CIM e suas variantes eram de 8 a 10 horas, Muntean e colaboradores propuseram o rCIM⁵⁷. O teste rCIM consiste em utilizar o sobrenadante da suspensão bacteriana incubada com disco de meropenem para avaliar seu efeito inibitório sobre o crescimento da cepa *E. coli* ATCC 25922, sensível a baixos níveis de meropenem. Em caso de degradação do meropenem, a adição do sobrenadante à cultura de *E. coli* ATCC 25922 não interfere no crescimento medido por nefelometria. Em caso de negatividade para carbapenemase, o sobrenadante adicionado ao caldo de cultura de *E. coli* ATCC 25922 impedirá o crescimento bacteriano, por conter meropenem intacto. Duas alças de 10 μ L cheias de crescimento bacteriano

recente são homogeneizadas em 1 mL de água estéril, e dois discos de meropenem.

O tubo contendo a suspensão e os discos é homogeneizado no vórtex por 1 min e incubado a 37°C por 30 min. Ao final da incubação, o tubo é novamente homogeneizado com vórtex por 1 min e, a seguir, centrifugado por 5 min a 10.000 rpm. Um volume de 500 µL do sobrenadante é transferido para suspensão de *E. coli* ATCC 25922 com turbidez equivalente a McFarland 1,0 em caldo TSB. O tubo do isolado suspeito e controles negativo e positivo são incubados a 37°C por 2 h com leitura em nefelômetro a cada 30 min. A leitura basal é subtraída da leitura após 90 min de incubação. Diferenças com valores >1,0 são indicativas de produção de carbapenemases, enquanto diferenças <0,5 indicam negatividade do teste. Testes com diferença entre 0,5 e 1,0 aos 90 min de incubação devem ser incubadas por mais 30 min. Caso o valor da diferença persista nessa faixa, deve ser utilizado um outro método, imunológico por molecular.

Visando simplificar a execução do teste, Jing e colaboradores propuseram o sCIM⁵⁸. A modificação consiste em aplicar a massa bacteriana diretamente sobre disco de 10 µg de imipenem e, a seguir, aplicar o disco (com a face contendo o inóculo voltada para baixo) sobre a superfície do ágar Mueller-Hinton previamente inoculado com suspensão de *E. coli* ATCC 25922 com turbidez equivalente ao padrão 0,5 da escala de McFarland (*Enterobacteriales*) ou diluição 1/10 da mesma escala (*P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp.). Após incubação a 35°C por 16–18 h, isolados produtores de carbapenemases apresentam diâmetro de halo de inibição de 6–20 mm ou colônias dentro do halo de 21 ou 22 mm. Diâmetros de halo ≥ 26 mm são considerados negativos e diâmetros de 23 a 25 são considerados indeterminados. Para *Enterobacteriales*, a concordância com os resultados de PCR foi de 99,5% e para *Acinetobacter* e *P. aeruginosa* 100%. A principal limitação do teste é o tempo de leitura de 16 a 18 horas.

Mais recentemente, foi proposta a realização do teste mCIM diretamente de hemoculturas positivas, sendo a modificação designada blood-mCIM⁵⁹. Quatro gotas do caldo de uma hemocultura positiva são inoculadas em 2 mL de caldo TSB contendo 1 disco de 10 µg de meropenem e a seguir a suspensão é homogeneizada por vórtex rapidamente e incubada a 35°C em ar ambiente por 4 horas. O disco de meropenem é removido e aplicado sobre a superfície do ágar Mueller-Hinton previamente inoculado com suspensão de *E. coli* ATCC 25922 com turbidez equivalente ao padrão 0,5 da escala de McFarland. Após incubação em ar ambiente 35°C por 18 a 24 h, os resultados são inter-

pretados como descrito originalmente para mCIM por Pierce colaboradores. A principal limitação do teste é o tempo de leitura de 16 a 18 horas.

5.3.3 Métodos acidimétricos para detecção de carbapenemases

O uso de indicadores de pH (vermelho de fenol) para detecção de hidrólise de β -lactâmicos foi originalmente descrito por Rubin e Smith em 1973⁶⁰, que demonstraram que a hidrólise do anel β -lactâmico levava à acidificação do meio; entretanto, o método só ganhou notoriedade com a descrição das modificações propostas por Nordmann e colaboradores⁶¹ e Pires e colaboradores⁶², que propuseram o uso do método para detecção de carbapenemases. Enquanto a primeira modificação propunha o uso do vermelho de fenol como indicador de pH, a segunda propôs o uso do azul de bromotimol para a mesma finalidade utilizando o imipenem injetável como substrato.

Os dois métodos estão disponíveis comercialmente no Brasil. Ambos indicadores de pH apresentam a coloração amarela quando em pH ácido. Subsequentemente Nordmann e colaboradores descreveram uma modificação do teste original com uso de inibidores, permitindo a caracterização do tipo de carbapenemase, utilizando o tazobactam como inibidor de carbapenemases da classe A de Ambler (principal grupo KPC) e EDTA como inibidor de carbapenemases da classe B de Ambler (principal grupo NDM)⁶³. O teste, inicialmente descrito com 100% de especificidade e sensibilidade pelos autores do método Carba-NP, mostrou menor sensibilidade – 80% – para amostragens contendo maior número de carbapenemases fracas, a exemplo de OXA-48⁶⁴. Em estudo realizado com isolados do Brasil, incluindo produtores de OXA-370, a sensibilidade e especificidade do Carba-NP foram de 62,7% e 97,5%⁵⁴. Dois outros estudos realizados no Brasil evidenciaram que o método pode ser utilizado em concentrados bacterianos obtidos a partir de hemoculturas positivas com excelente sensibilidade para KPC^{65,66}. Uma segunda modificação, designada CarbAcineto NP foi proposta por Dortet e colaboradores⁶⁷.

A modificação substitui o tampão de lise do método original por solução de NaCl 5M e o aumento do inóculo (o dobro do inicialmente proposto no teste original). O inóculo bacteriano equivalente a uma alça de 10 μ L é transferida para cada um de dois microtubos contendo 200 μ L de NaCl 5M. Após homogeneização em vórtex e incubação a 35°C por 20 minutos, a suspensão é dividida em dois tubos com 100 μ L e a solução contendo vermelho de fenol e imipenem (6 mg/mL) é adicionada ao tubo teste e a mesma solução sem imipenem é adicionada ao tubo controle e a seguir os dois tubos são incubados a 37°C por um máximo de 2 horas. A sensibilidade do teste é de 94,7% e a especificidade 100%⁶⁷.

Recentemente, uma nova modificação do Carba-NP, designada “CPO *complete*”, foi proposta por Thomson e colaboradores⁶⁸. O CPO *complete* não utiliza o passo de lise bacteriana prévia à adição da solução de vermelho de fenol com imipenem. Uma das soluções, a solução A, contém 12 mg imipenem/cilastatina injetável, 10 mg timerosal, 5 mg de glicose e 4 mg de polimixina em 1 mL de caldo Mueller-Hinton, 30 µL sulfato de zinco 0,3 N e 140 µL de solução de vermelho de fenol. O pH foi ajustado para 7,0. A um volume de solução A de 30 µL é adicionada o inóculo bacteriano equivalente a alça de 1 µL. O teste é incubado por até 90 min a 37°C, sendo que uma coloração amarela indica positividade.

Para caracterização do tipo de carbapenemase são utilizados 30 µL de uma solução denominada solução B, que contém, além de 30 µL da solução A, 2 µL solução de AFB (20 mg/mL em partes iguais de DMSO e água) e 840 µL solução de vermelho de fenol. O pH final da solução é 7,5. A solução C contém 30 µL de solução A, 2 µL de solução de ácido dipicolínico (235 mg em 10 mL de tampão Tris-EDTA 100x concentrado) e 1.400 µL de solução de vermelho de fenol. O pH final da solução é pH 6,8. As soluções B e C são inoculadas da mesma forma que a solução A. A coloração amarela nos dois tubos após a incubação indica co-produção de carbapenemases de classes A e B. Coloração amarela apenas no tubo B indica carbapenemase de classes B (metalo-β-lactamase), enquanto esta coloração apenas no tubo C indica carbapenemase de classe A. Segundo os autores, o teste tem 100% de sensibilidade e 98,5% de especificidade para detecção de carbapenemases, sendo que 99,0% dos isolados contendo um único tipo de carbapenemase foram classificados corretamente quanto ao tipo de carbapenemase.

- ⇒ β-CARBA test é um kit comercial com substrato cromogênico e permite a detecção de carbapenemases em *Enterobacteriales* e *Acinetobacter spp.* A vantagem é o tempo de reação de 30 min e a limitação é a perda da sensibilidade para carbapenemases que não sejam do tipo KPC. Para NDM a sensibilidade é de 85,3% e para OXA-48-like a sensibilidade é de 80,5%. Tem uma sensibilidade muito boa – 90,3% – para enzimas do tipo OXA em *Acinetobacter spp.*⁶⁹.
- ⇒ O teste Carbapenembac se constitui de fitas impregnadas com solução de carbapenêmicos associada a um agente revelador. À fita, é aplicado 150 µL de uma suspensão bacteriana densa com auxílio de uma micropipeta. A fita é, então, incubada por 60 minutos. Após, é aplicada uma solução de iodo especial e, caso a bactéria seja produtora de carbapenemases, a cor roxa previamente existente irá sumindo, surgindo uma coloração amarela, entre 15 e 90 min. Essa metodologia foi avaliada por alguns autores, encontrando 100% de sensibilidade e especificidade variando de 96,5% a 100%^{70,71}.

5.3.4 Detecção da hidrólise de carbapenêmicos por espectrometria de massas

Os espectrômetros de massas atualmente registrados no Brasil – BrukerDaltonics e bioMérieux permitem a detecção de carbapenemases avaliando o espectro de relação massa/carga após exposição do ertapenem ou meropenem à suspensão bacteriana. O teste é lido após 2 horas de incubação e apresenta excelentes sensibilidade e especificidade desde que para detecção de OXA-48-like seja adicionado NH_4HCO_3 ao tampão de reação⁷². Como a ação de uma β -lactamase consta de uma etapa inicial de hidrólise e posteriormente descarboxilação, o produto da degradação dos carbapenêmicos tem menor massa que o produto intacto. Pode-se observar, portanto, a ausência ou redução do pico correspondente ao carbapenêmico intacto e aparecimento de pico correspondente ao composto hidrolisado e descarboxilado. A dificuldade na realização do teste é a necessidade de calibração do equipamento para uma faixa de massa distinta daquela utilizada para identificação bacteriana e interpretação visual dos espectros obtidos. Essa subjetividade é eliminada com o uso do teste MBT STAR-BL⁷³, disponível apenas para o equipamento da BrukerDaltonics.

5.3.5 Testes imunocromatográficos para detecção de carbapenemases

Os testes imunocromatográficos têm sido amplamente utilizados para diagnóstico rápido em medicina laboratorial. O princípio do teste consiste na captura do antígeno eventualmente presente na amostra com anticorpos específicos ligados a nanopartículas de ouro coloidal ligadas a uma membrana de nitrocelulose⁷⁴. Estão disponíveis comercialmente vários produtos, a exemplo de Resist-5 O.O.K.N.V. (detecta OXA-48, OXA-163, KPC, NDM e VIM) e Resist-4 O.O.K.N.V. (detecta OXA-48, KPC, NDM e VIM) ambos do fabricante Coris-Bioconcept. O teste pode ser utilizado em culturas puras⁷⁵, mas também em hemoculturas positivas com 100% de sensibilidade e especificidade com prolongamento do tempo de leitura (76). Pode, também, ser utilizado em amostras de *swab* retal, que tenham sido previamente cultivadas em meio líquido^{77,78}. O tempo total de ensaio é de até 16 minutos, mas resultados positivos já podem ser observados em 1 minuto após a adição da suspensão bacteriana ao dispositivo.

Mais recentemente foi lançado no mercado o produto NG-Test Carba 5, capaz de detectar os grupos de carbapenemases KPC, OXA-48-like, VIM, IMP e NDM⁷⁹⁻⁸¹. Da mesma forma que os produtos da Coris, pode ser utilizado para detecção de carbapenemases em hemoculturas positivas⁸².

As vantagens dos testes imunocromatográficos são a rapidez, com obtenção de resultados em menos de 30 minutos, a simplicidade da execução do

ensaio, a disponibilidade de kits comerciais; entretanto apresentam elevado custo.

5.3.6 Detecção de carbapenemases em sistemas de automação

⇒ Recentemente foi lançado no mercado o teste CPO do sistema Phoenix (Becton-Dickinson), capaz de detectar e diferenciar carbapenemases. O teste detecta e identifica carbapenemases de classes A, B e D de Ambler e utiliza meropenem, doripenem, temocilina e cloxacilina isoladamente e em combinação com diferentes inibidores de carbapenemases. O estudo mais recente sobre o desempenho do teste foi realizado com desenho retrospectivo e prospectivo, indicando 92,4% de acurácia na detecção de isolados produtores de carbapenemases, 97,8% de sensibilidade e 87,1% de especificidade na sessão de análises retrospectiva⁸³. Quanto à classificação, o teste foi capaz de alocar as carbapenemases nas classes A, B, e D em 81,3% dos casos, com acurácia de 94,6%. Quando avaliou amostras de forma prospectiva, o estudo evidenciou acurácia de 77,8%, 100% de sensibilidade e 67,8% de especificidade em 135 isolados suspeitos de produção de carbapenemase e 98,8% de acurácia e sensibilidade em isolados não suspeitos de produção de carbapenemases⁸³. A grande vantagem do teste é a eliminação de etapas manuais para detecção de carbapenemases.

5.4 Testes alternativos para a detecção de resistência às polimixinas

Ao longo da década de 90, o uso das polimixinas era consideravelmente restrito e limitava-se ao tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa* e *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos. Após 2010, com a disseminação de cepas de *Enterobacterales* produtoras de KPC na maioria dos países dos diferentes continentes, e concomitante indisponibilidade de novos antimicrobianos para uso clínico, houve uma retomada do uso das polimixinas e conseqüentemente um aumento progressivo nas taxas de resistência às polimixinas. O principal gênero que expressa resistência adquirida às polimixinas é *Klebsiella* spp. e o mecanismo mais frequente é a modificação do alvo das polimixinas, o LPS. A interrupção do gene *mgr* é o mecanismo que mais frequentemente leva à resistência às polimixinas⁸⁴. Mais recentemente foram descritos os genes *mcr* – mobile colistin resistance – que codificam uma transferase capaz de modificar as moléculas de LPS adicionando a elas a fosfoetanolamina^{85,86}.

Atualmente, o único método recomendado pelo EUCAST/BrCAST para a avaliação da sensibilidade às polimixinas é a microdiluição em caldo não automatizada (www.brkast.org.br). Há na literatura, entretanto, descrição de métodos alternativos para a detecção da resistência a esses compostos, tais como eluição do disco⁸⁷, teste da gota (<http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2019/06/Protocolo->

[COLISTIN-DROP-TEST.pdf](#)), disco combinado⁸⁸, MALDIxin⁸⁹, triagem com ágar contendo polimixina⁹⁰.

O teste da eluição do disco consiste em eluir discos de colistina em caldo Mueller-Hinton cátion-ajustado (CMHCA) e realizar diluições $\frac{1}{2}$ de modo a obter soluções de colistina nas concentrações a serem testadas, sem necessidade de aquisição do sal do antimicrobiano, pesagem em balança analítica e esterilização de solução de antimicrobiano por filtração. É, portanto, o método mais próximo do método padrão ouro, diferindo apenas quanto ao preparo inicial da solução mais concentrada de colistina. O método de eluição para colistina foi publicado por Simner e colaboradores⁸⁷. Recentemente o método foi avaliado com isolados do Brasil e evidenciou taxas de erros graves e muito graves de 12 a 20% e 4,6 a 11,6%⁹¹, o que torna o método não aceitável para uso em diagnóstico.

O teste da gota também foi desenvolvido pelo Instituto Dr. Carlos Malbrán (<http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2019/06/Protocolo-COLISTIN-DROP-TEST.pdf>). Consiste em adicionar uma gota de solução de colistina a 16 mg/L. Para preparar a solução é necessário adicionar 8 discos de 10 µg de colistina a 5 mL de CMHCA e deixar em repouso por 1 h. Uma gota (10 µL) é adicionada à placa de ágar Mueller-Hinton inoculada com suspensão bacteriana com turbidez equivalente ao padrão 0,5 da escala de McFarland. A placa é incubada a 35°C por 16 a 18 horas e a seguir observada quanto à presença de halo de inibição.

A presença de halo de inibição com qualquer diâmetro indica sensibilidade. Segundo os autores o teste apresenta concordância categórica de 97,8 a 98,2% e taxa de erros muito graves de 2,1%, acima do valor aceitável pelo *Food and Drug Administration* (1,5%). Nordmann e colaboradores descreveram o RapidPolymyxin NP test, que consiste em avaliar a fermentação da glicose na presença de colistina ou polimixina B. Os isolados resistentes são capazes de metabolizar a glicose da presença de polimixina, alterando o pH do meio e resultando na mudança de cor do vermelho de fenol para amarelo. É um teste rápido e tem ótimo desempenho em isolados com CIM ≥ 8 mg/L ou ≤ 1 mg/L; entretanto apresenta resultados falsamente positivos para isolados com CIMs de 2 ou 4 mg/L⁹². O teste pode ser aplicado a concentrados bacterianos obtidos de hemoculturas positivas⁹³. O desempenho do teste depende da epidemiologia local e, portanto, cada laboratório deve avaliá-lo antes da implementação em rotina. Por exemplo, na grande São Paulo, cerca de 25% das cepas de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos têm CIM de 2 mg/L, o que torna o teste de pouca utilidade face à taxa de falsos positivos⁹⁴. Por outro lado, Dalmolin e colaboradores observaram sensibilidade e especificidade de 98% para o teste em isolados do sul do Brasil⁹⁵. Os valores observados nos dois trabalhos para especificidade e sensibilidade têm como limitação o número limitado de isolados com valores de CIM próximos ao valor de corte de 2 mg/L.

Um método alternativo que permite a detecção de cepas produtoras de MCR-1 é a adição de EDTA ao disco de colistina. Um aumento ≥ 3 mm no diâmetro do halo de inibição após adição de 10 μ L de EDTA 0,1M é considerado um teste positivo para MCR⁸⁸. Os autores referem sensibilidade de 96,7% e especificidade de 89,6% para detecção de MCR-1, mas há necessidade de estudos multicêntricos para que seja avaliada a robustez do método em diferentes laboratórios, considerando a pequena diferença de halo (3 mm) para a positividade do teste.

5.5 Referências bibliográficas

1. Bush K. Past and Present Perspectives on β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(10):e01076-18, /aac/62/10/e01076-18.atom.
2. Bush K, Jacoby GA. Updated Functional Classification of β -Lactamases. *AAC.* 2010;54(3):969–76.
3. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 1995;39(6):1211–33.
4. The structure of β -lactamases. *Phil Trans R Soc Lond B.* 1980;289(1036):321–31.
5. Jones RN, Marshall SA. Antimicrobial activity of cefepime tested against bush group I β -lactamase-producing strains resistant to ceftazidime a multilaboratory national and international clinical isolate study. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 1994;19(1):33–8.
6. Gales AC, Bolmström A, Sampaio J, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial Susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* Producing Extended-Spectrum beta-lactamase (ESBL) Isolated in Hospitals in Brazil. *Braz J Infect Dis.* 1997;1(4):196–203.
7. Bonnet R, Sampaio JLM, Labia R, De Champs C, Sirot D, Chanal C, et al. A Novel CTX-M β -Lactamase (CTX-M-8) in Cefotaxime-Resistant Enterobacteriaceae Isolated in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(7):1936–42.
8. Sampaio JLM, Gales AC. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brazil: focus on β -lactams and polymyxins. *Brazilian Journal of Microbiology.* 2016;47:31–7.
9. Bradford PA. Extended-Spectrum β -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14(4):933–51.
10. Kliebe C, Nies BA, Meyer JF, Tolxdorff-Neutzling RM, Wiedemann B. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 1985;28(2):302–7.

11. Rawat D, Nair D. Extended-spectrum β -lactamases in gram negative bacteria. *J Global Infect Dis.* 2010;2(3):263.
12. Livermore DM. Defining an extended-spectrum β -lactamase. *Clinical Microbiology and Infection.* 2008;14:3–10.
13. BrCAST. Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos. Disponível em: <http://brcast.org.br>
14. Oliver A, Weigel LM, Rasheed JK, McGowan JE, Raney P, Tenover FC. Mechanisms of Decreased Susceptibility to Cefpodoxime in *Escherichia coli*. *AAC.* 2002;46(12):3829–36.
15. Hirakata Y, Matsuda J, Miyazaki Y, Kamihira S, Kawakami S, Miyazawa Y, *et al.* Regional variation in the prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing clinical isolates in the Asia-Pacific region (SENTRY 1998–2002). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 2005;52(4):323–9.
16. Jeong SH, Song W, Kim J-S, Kim H-S, Lee KM. Broth Microdilution Method To Detect Extended-Spectrum β -Lactamases and AmpC β -Lactamases in Enterobacteriaceae Isolates by Use of Clavulanic Acid and Boronic Acid as Inhibitors. *Journal of Clinical Microbiology.* 2009;47(11):3409–12.
17. Drieux L, Brossier F, Sougakoff W, Jarlier V. Phenotypic detection of extended-spectrum β -lactamase production in *Enterobacteriaceae*: review and bench guide. *Clinical Microbiology and Infection.* 2008;14:90–103.
18. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-Spectrum β -Lactamases: a Clinical Update. *CMR.* 2005;18(4):657–86.
19. Spanu T, Sanguinetti M, Tumbarello M, D’Inzeo T, Fiori B, Posteraro B, *et al.* Evaluation of the New VITEK 2 Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) Test for Rapid Detection of ESBL Production in Enterobacteriaceae Isolates. *Journal of Clinical Microbiology.* 2006;44(9):3257–62.
20. Thomson KS, Cornish NE, Hong SG, Hemrick K, Herdt C, Moland ES. Comparison of Phoenix and VITEK 2 Extended-Spectrum β -Lactamase Detection Tests for Analysis of *Escherichia coli* and *Klebsiella* Isolates with Well-Characterized β -Lactamases. *Journal of Clinical Microbiology.* 2007;45(8):2380–4.
21. Wiegand I, Geiss HK, Mack D, Sturenburg E, Seifert H. Detection of Extended-Spectrum Beta-Lactamases among *Enterobacteriaceae* by Use of Semiautomated Microbiology Systems and Manual Detection Procedures. *Journal of Clinical Microbiology.* 2007;45(4):1167–74.
22. Platteel TN, Cohen Stuart JW, de Neeling AJ, Voets GM, Scharringa J, van de Sande N, *et al.* Multi-centre evaluation of a phenotypic extended spectrum β -lactamase detection guideline in the routine setting. *Clinical Microbiology and Infection.* 2013;19(1):70–6.

23. EUCAST. Technical guidance on the use of the combination disk test (CDT) for confirmation of ESBL in Enterobacterales. [Internet]. Disponível em: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Miscellaneous/Guidance_document_Confirmation_of_ESBL.pdf
24. Towne TG, Lewis JS, Herrera M, Wickes B, Jorgensen JH. Detection of SHV-Type Extended-Spectrum Beta-Lactamase in *Enterobacter* Isolates : TABLE 1. J Clin Microbiol. 2010;48(1):298–9.
25. Sturenburg E. Evaluation of a new cefepime-clavulanate ESBL Etest to detect extended-spectrum -lactamases in an Enterobacteriaceae strain collection. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. junho de 2004;54(1):134–8.
26. Jarlier V, Nicolas M-H, Fournier G, Philippon A. Extended Broad-Spectrum -Lactamases Conferring Transferable Resistance to Newer -Lactam Agents in Enterobacteriaceae: Hospital Prevalence and Susceptibility Patterns. Clinical Infectious Diseases. 1988;10(4):867–78.
27. Biedenbach DJ, Toleman M, Walsh TR, Jones RN. Analysis of Salmonella spp. with resistance to extended-spectrum cephalosporins and fluoroquinolones isolated in North America and Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–2004). Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2006;54(1):13–21.
28. Thomson KS, Sanders CC. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in members of the family Enterobacteriaceae: comparison of the double-disk and three-dimensional tests. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1992;36(9):1877–82.
29. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Rapid Detection of Extended-Spectrum- -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae. Journal of Clinical Microbiology. 2012;50(9):3016–22.
30. Renvoise A, Decre D, Amarsy-Guerle R, Huang T-D, Jost C, Podglajen I, *et al.* Evaluation of the Lacta Test, a Rapid Test Detecting Resistance to Third-Generation Cephalosporins in Clinical Strains of *Enterobacteriaceae*. Journal of Clinical Microbiology. 2013;51(12):4012–7.
31. Blane B, Brodrick HJ, Gouliouris T, Ambridge KE, Kidney AD, Ludden CM, *et al.* Comparison of 2 chromogenic media for the detection of extended-spectrum β -lactamase producing Enterobacteriaceae stool carriage in nursing home residents. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2016;84(3):181–3.
32. El-Jade MR, Parcina M, Schmithausen RM, Stein C, Meilaender A, Hoerauf A, *et al.* ESBL Detection: Comparison of a Commercially Available Chromogenic Test for Third Generation Cephalosporine Resistance and Automated Susceptibility Testing in *Enterobacteriaceae*. Chang Y-F, organizador. PLoS ONE. 2016;11(8):e0160203.

33. Bauernfeind A, Schneider I, Jungwirth R, Sahly H, Ullmann U. A novel type of AmpC beta-lactamase, ACC-1, produced by a *Klebsiella pneumoniae* strain causing nosocomial pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(8):1924–31.
34. Jacoby GA. AmpC β -Lactamases. *CMR.* 2009;22(1):161–82.
35. Rocha DAC, Campos JC, Passadore LF, Sampaio SCF, Nicodemo AC, Sampaio JLM. Frequency of Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamases in *Escherichia coli* Isolates from Urine Samples in São Paulo, Brazil. *Microbial Drug Resistance.* 2016;22(4):321–7.
36. Naas T, Oueslati S, Bonnin RA, Dabos ML, Zavala A, Dortet L, *et al.* Beta-lactamase database (BLDB) – structure and function. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry.* 2017;32(1):917–9.
37. Edquist P, Ringman M, Liljequist BO, Wisell KT, Giske CG. Phenotypic detection of plasmid-acquired AmpC in *Escherichia coli*—evaluation of screening criteria and performance of two commercial methods for the phenotypic confirmation of AmpC production. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2013;32(9):1205–10.
38. Tan TY, Ng LSY, He J, Koh TH, Hsu LY. Evaluation of Screening Methods To Detect Plasmid-Mediated AmpC in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis*. *AAC.* 2009;53(1):146–9.
39. Bonomo RA, Burd EM, Conly J, Limbago BM, Poirel L, Segre JA, *et al.* Carbapenemase-Producing Organisms: A Global Scourge. *Clinical Infectious Diseases.* 2018;66(8):1290–7.
40. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the Versatile β -Lactamases. *CMR.* julho de 2007;20(3):440–58.
41. Girlich D, Bonnin RA, Jousset A, Naas T. Promoter characterization and expression of the blaKPC-2 gene in *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2017;72(6):1597–601.
42. Naas T, Cuzon G, Truong H-V, Nordmann P. Role of IS *Kpn7* and Deletions in bla_{KPC} Gene Expression. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(9):4753–9.
43. Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, Poirel L, Woodford N, Miriagou V. Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clinical Microbiology and Infection.* 2012;18(5):432–8.
44. Maurer FP, Castelberg C, Quiblier C, Bloemberg GV, Hombach M. Evaluation of Carbapenemase Screening and Confirmation Tests with *Enterobacteriaceae* and Development of a Practical Diagnostic Algorithm. Patel R, organizador. *J Clin Microbiol.* 2015;53(1):95–104.
45. Antonelli A, Giani T, Di Pilato V, Riccobono E, Perriello G, Mencacci A, *et al.* KPC-31 expressed in a ceftazidime/avibactam-resistant *Klebsiella pneumoniae* is

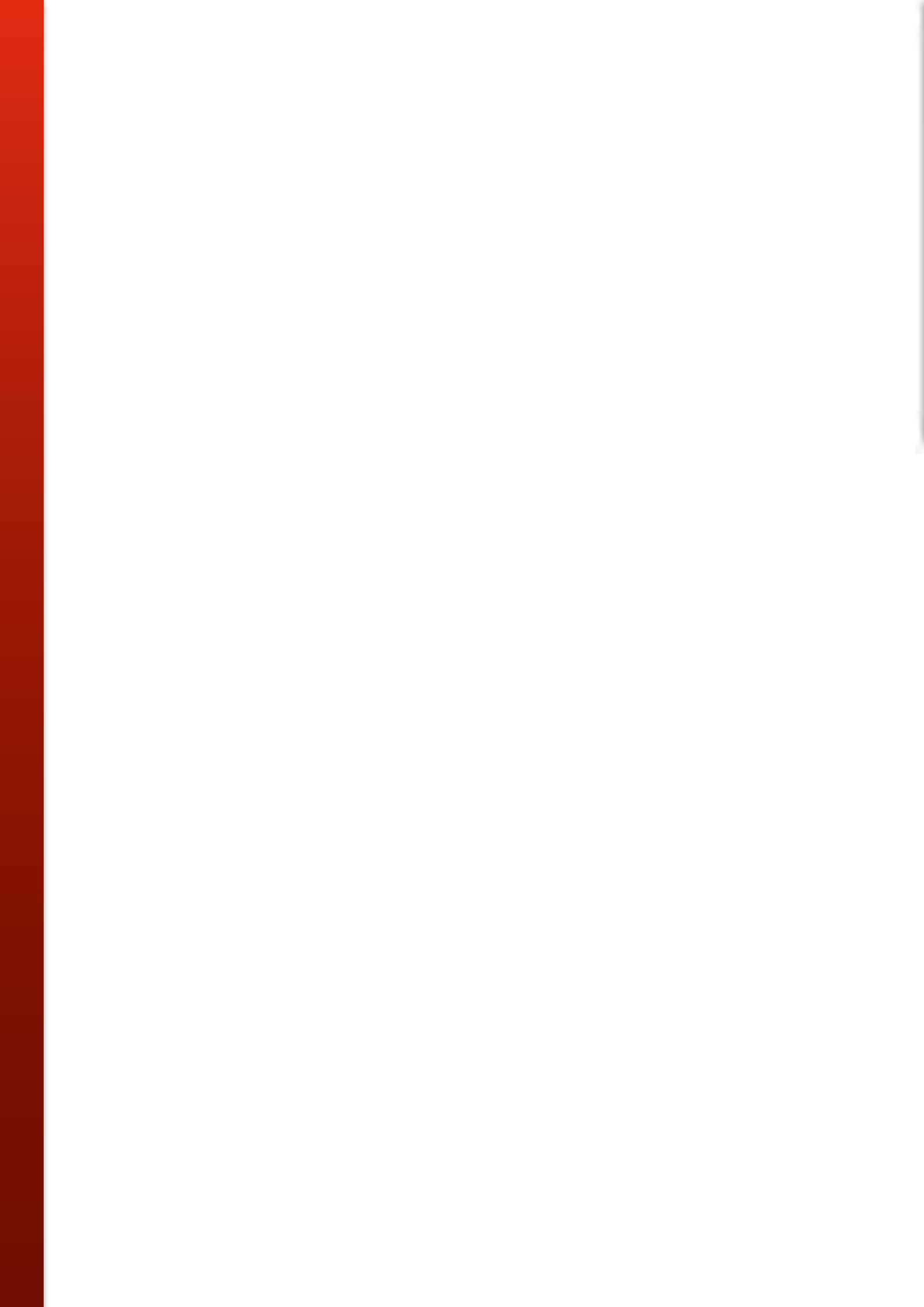
- associated with relevant detection issues. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2019;74(8):2464–6.
46. Tsakris A, Themeli-Digalaki K, Poulou A, Vrioni G, Voulgari E, Koumaki V, *et al*. Comparative Evaluation of Combined-Disk Tests Using Different Boronic Acid Compounds for Detection of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae Clinical Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011;49(8):2804–9.
 47. Bou G, Vila J, Seral C, Javier Castillo F. Detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in various scenarios and health settings. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2014;32:24–32.
 48. Giske CG, Gezelius L, Samuelsen Ø, Warner M, Sundsfjord A, Woodford N. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo- β -lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. *Clinical Microbiology and Infection*. 2011;17(4):552–6.
 49. Magagnin CM, Rozales FP, Antochévis L, Nunes LS, Martins AS, Barth AL, *et al*. Dissemination of bla OXA-370 gene among several *Enterobacteriaceae* species in Brazil. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017;36(10):1907–10.
 50. Sampaio JLM, Ribeiro VB, Campos JC, Rozales FP, Magagnin CM, Falci DR, *et al*. Detection of OXA-370, an OXA-48-Related Class D β -Lactamase, in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(6):3566–7.
 51. Pereira PS, Borghi M, de Araújo CFM, Aires CAM, Oliveira JCR, Asensi MD, *et al*. Clonal Dissemination of OXA-370-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Rio de Janeiro, Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(8):4453–6.
 52. van der Zwaluw K, de Haan A, Pluister GN, Bootsma HJ, de Neeling AJ, Schouls LM. The Carbapenem Inactivation Method (CIM), a Simple and Low-Cost Alternative for the Carba NP Test to Assess Phenotypic Carbapenemase Activity in Gram-Negative Rods. Rohde H, organizador. *PLoS ONE*. de 2015;10(3):e0123690.
 53. Tamma PD, Opene BNA, Gluck A, Chambers KK, Carroll KC, Simner PJ. Comparison of 11 Phenotypic Assays for Accurate Detection of Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae*. Bourbeau P, organizador. *J Clin Microbiol*. 2017;55(4):1046–55.
 54. Pancotto LR, Nodari CS, Rozales FP, Soldi T, Siqueira CG, Freitas AL, *et al*. Performance of rapid tests for carbapenemase detection among Brazilian *Enterobacteriaceae* isolates. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2018;49(4):914–8.
 55. Pierce VM, Simner PJ, Lonsway DR, Roe-Carpenter DE, Johnson JK, Brasso WB, *et al*. Modified Carbapenem Inactivation Method for Phenotypic Detection of

- Carbapenemase Production among Enterobacteriaceae. Ledebauer NA, organizador. J Clin Microbiol. 2017;55(8):2321–33.
56. Sfeir MM, Hayden JA, Fauntleroy KA, Mazur C, Johnson JK, Simner PJ, *et al.* EDTA-Modified Carbapenem Inactivation Method: a Phenotypic Method for Detecting Metallo- β -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae*. Ledebauer NA, organizador. J Clin Microbiol. 2019;57(5):e01757-18, /jcm/57/5/JCM.01757-18.atom.
 57. Muntean M-M, Muntean A-A, Gauthier L, Creton E, Cotellon G, Popa MI, *et al.* Evaluation of the rapid carbapenem inactivation method (rCIM): a phenotypic screening test for carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2018;73(4):900–8.
 58. Jing X, Zhou H, Min X, Zhang X, Yang Q, Du S, *et al.* The Simplified Carbapenem Inactivation Method (sCIM) for Simple and Accurate Detection of Carbapenemase-Producing Gram-Negative Bacilli. Front Microbiol. 2018;9:2391.
 59. Sfeir MM, Satlin MJ, Fauntleroy KA, Jenkins SG, Westblade LF. Blood-Modified Carbapenem Inactivation Method: a Phenotypic Method for Detecting Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* Directly from Positive Blood Culture Broths. Ledebauer NA, organizador. J Clin Microbiol. 2019;58(2):e01377-19, /jcm/58/2/JCM.01377-19.atom.
 60. Rubin FA, Smith DH. Characterization of R Factor -Lactamases by the Acidimetric Method. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1973;3(1):68–73.
 61. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid Detection of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. Emerg Infect Dis. 2012;18(9):1503–7.
 62. Pires J, Novais A, Peixe L. Blue-Carba, an Easy Biochemical Test for Detection of Diverse Carbapenemase Producers Directly from Bacterial Cultures. Journal of Clinical Microbiology. 2013;51(12):4281–3.
 63. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid Identification of Carbapenemase Types in Enterobacteriaceae and Pseudomonas spp. by Using a Biochemical Test. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56(12):6437–40.
 64. Tijet N, Boyd D, Patel SN, Mulvey MR, Melano RG. Evaluation of the Carba NP Test for Rapid Detection of Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57(9):4578–80.
 65. Seco BMS, Campos JC, da Costa Rocha DA, de Lima AV, de Oliveira FF, Lemo MEB, *et al.* Improved blood culture workflow for faster identification of KPC-producing Enterobacterales. Braz J Microbiol. 2019;50(1):127–32.
 66. Lima-Morales D de, Ávila H, Soldi T, Dalmolin TV, Lutz L, Aquino V, *et al.* Rapid Detection of Carbapenemase Production Directly from Blood Culture by Colorimetric Methods:

- Evaluation in a Routine Microbiology Laboratory. Ledebauer NA, organizador. *J Clin Microbiol.* 2018;56(9):e00325-18, /jcm/56/9/e00325-18.atom.
67. Dortet L, Poirel L, Errera C, Nordmann P. CarbAcineto NP Test for Rapid Detection of Carbapenemase-Producing *Acinetobacter* spp. *Journal of Clinical Microbiology.* 2014;52(7):2359–64.
 68. Thomson GK, AbdelGhani S, Thomson KS. CPO Complete, a novel test for fast, accurate phenotypic detection and classification of carbapenemases. del Campo R, organizador. *PLoS ONE.* 2019;14(12):e0220586.
 69. Bernabeu S, Dortet L, Naas T. Evaluation of the β -CARBA™ test, a colorimetric test for the rapid detection of carbapenemase activity in Gram-negative bacilli. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2017;72(6):1646–58.
 70. Martino MDV, Koga PCM, Pasternak J, Doi AM, Ciola CS, da Silva CB, *et al.* Evaluation of a new rapid test for carbapenemase detection in carbapenem resistant Enterobacteriaceae. *Journal of Microbiological Methods.* 2015;115:20–1.
 71. Cordeiro-Moura JR, Fehlberg LCC, Nodari CS, Matos AP de, Alves V de O, Cayô R, *et al.* Performance of distinct phenotypic methods for carbapenemase detection: The influence of culture media. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 2020;96(1):114912.
 72. Papagiannitsis CC, Študentová V, Izdebski R, Oikonomou O, Pfeifer Y, Petinaki E, *et al.* Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry Meropenem Hydrolysis Assay with NH_4HCO_3 , a Reliable Tool for Direct Detection of Carbapenemase Activity. Burnham C-AD, organizador. *J Clin Microbiol.* 2015;53(5):1731–5.
 73. Kawamoto Y, Kosai K, Yamakawa H, Kaku N, Uno N, Morinaga Y, *et al.* Performance evaluation of the MALDI Biotyper Selective Testing of Antibiotic Resistance– β -Lactamase (MBT STAR-BL) assay for the detection of IMP metallo- β -lactamase activity in Enterobacteriaceae. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 2018;92(4):275–8.
 74. Pasteran F, Denorme L, Ote I, Gomez S, De Belder D, Glupczynski Y, *et al.* Rapid Identification of OXA-48 and OXA-163 Subfamilies in Carbapenem-Resistant Gram-Negative Bacilli with a Novel Immunochromatographic Lateral Flow Assay. Patel R, organizador. *J Clin Microbiol.* 2016;54(11):2832–6.
 75. Ramos AC, Gales AC, Monteiro J, Silbert S, Chagas-Neto T, Machado AMO, *et al.* Evaluation of a rapid immunochromatographic test for detection of distinct variants of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) in Enterobacteriaceae. *Journal of Microbiological Methods.* 2017;142:1–3.

76. Wink PL, Martins AS, Inamine E, Dalmolin TV, Barth AL. Rapid detection of the main carbapenemases in Brazil directly from spiked blood culture using the RESIST-3 O.K.N. immunoassay. *Braz J Microbiol.* 2019;50(3):657–62.
77. Nodari CS, Gales AC, Barth AL, Magagnin CM, Zavascki AP, Carvalhaes CG. Detection of OXA-370 directly from rectal swabs and blood culture vials using an immunochromatographic assay. *Journal of Microbiological Methods.* 2017;139:92–4.
78. Fauconnier C, Dodemont M, Depouhon A, Anantharajah A, Verroken A, Rodriguez-Villalobos H. Lateral flow immunochromatographic assay for rapid screening of faecal carriage of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2019;74(2):357–9.
79. Volland H, Girlich D, Laguide M, Gonzalez C, Paris V, Laroche M, *et al.* Improvement of the Immunochromatographic NG-Test Carba 5 Assay for the Detection of IMP Variants Previously Undetected. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019;64(1):e01940-19, /aac/64/1/AAC.01940-19.atom.
80. Potron A, Fournier D, Emeraud C, Triponney P, Plésiat P, Naas T, *et al.* Evaluation of the Immunochromatographic NG-Test Carba 5 for Rapid Identification of Carbapenemase in Nonfermenters. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019;63(9):e00968-19/aac/63/9/AAC.00968-19.atom.
81. Hopkins KL, Meunier D, Naas T, Volland H, Woodford N. Evaluation of the NG-Test CARBA 5 multiplex immunochromatographic assay for the detection of KPC, OXA-48-like, NDM, VIM and IMP carbapenemases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2018; 1;73(12):3523-3526. doi: 10.1093/jac/dky342
82. Giordano L, Fiori B, D’Inzeo T, Parisi G, Liotti FM, Menchinelli G, *et al.* Simplified Testing Method for Direct Detection of Carbapenemase-Producing Organisms from Positive Blood Cultures Using the NG-Test Carba 5 Assay. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019;63(7):e00550-19, /aac/63/7/AAC.00550-19.atom.
83. Croxatto A, Coste AT, Pillonel T, Bertelli C, Greub G, Prod’hom G. Evaluation of the BD Phoenix™ CPO Detect Test for the detection of carbapenemase producers. *Clinical Microbiology and Infection.* 2020;26(5):644.e9-644.e15.
84. Olaitan AO, Morand S, Rolain J-M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol.* 2014; 5:643
85. Schultsz C, Geerlings S. Plasmid-Mediated Resistance in *Enterobacteriaceae*: Changing Landscape and Implications for Therapy. *Drugs.* 2012;72(1):1–16.
86. Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR, Yi L-X, Zhang R, Spencer J, *et al.* Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases.* 2016;16(2):161–8.

87. Simner PJ, Bergman Y, Trejo M, Roberts AA, Marayan R, Tekle T, *et al.* Two-Site Evaluation of the Colistin Broth Disk Elution Test To Determine Colistin *In Vitro* Activity against Gram-Negative Bacilli. Burnham C-AD, organizador. J Clin Microbiol. 2018;57(2):e01163-18, /jcm/57/2/JCM.01163-18.atom.
88. Esposito F, Fernandes MR, Lopes R, Muñoz M, Sabino CP, Cunha MP, *et al.* Detection of Colistin-Resistant MCR-1-Positive *Escherichia coli* by Use of Assays Based on Inhibition by EDTA and Zeta Potential. Fenwick B, organizador. J Clin Microbiol. 2017;55(12):3454-65.
89. Dortet L, Broda A, Bernabeu S, Glupczynski Y, Bogaerts P, Bonnin R, *et al.* Optimization of the MALDixin test for the rapid identification of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* using MALDI-TOF MS. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2020;75(1):110-6.
90. Humphries RM, Green DA, Schuetz AN, Bergman Y, Lewis S, Yee R, *et al.* Multicenter Evaluation of Colistin Broth Disk Elution and Colistin Agar Test: a Report from the Clinical and Laboratory Standards Institute. Ledebouer NA, organizador. J Clin Microbiol. 2019;57(11):e01269-19, /jcm/57/11/JCM.01269-19.atom.
91. Dalmolin TV, Mazzetti A, Ávila H, Kranich J, Carneiro GIB, Arend LNVS, *et al.* Elution methods to evaluate colistin susceptibility of Gram-negative rods. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2020;96(1):114910.
92. Nordmann P, Jayol A, Poirel L. Rapid Detection of Polymyxin Resistance in *Enterobacteriaceae*. Emerg Infect Dis. 2016;22(6):1038-43.
93. Jayol A, Dubois V, Poirel L, Nordmann P. Rapid Detection of Polymyxin-Resistant *Enterobacteriaceae* from Blood Cultures. Bourbeau P, organizador. J Clin Microbiol. 2016;54(9):2273-7.
94. Bartolleti F, Seco BMS, Capuzzo dos Santos C, Felipe CB, Lemo MEB, Alves T da S, *et al.* Polymyxin B Resistance in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*, São Paulo, Brazil. Emerg Infect Dis. 2016;22(10):1849-51.
95. Dalmolin TV, Dias GÁ, de Castro LP, Ávila H, Magagnin CM, Zavascki AP, *et al.* Detection of Enterobacterales resistant to polymyxins using Rapid Polymyxins NP test. Braz J Microbiol. 2019;50(2):425-8.



Capítulo 6:

Testes genotípicos para a detecção de mecanismos de resistência e avaliação da similaridade genética

Ana Paula D'Alincourt Carvalho Assef
Ivson Cassiano de Oliveira Santos
Melise Chaves Silveira

6.1 Detecção de marcadores genéticos de resistência

O método mais utilizado para a detecção molecular da resistência adquirida é a amplificação do DNA alvo através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, *Polymerase Chain Reaction*). Essa metodologia é muito útil para a detecção de genes adquiridos, como genes codificadores de ESBLs, carbapenemases, resistência plasmidial às polimixinas (genes *mcr*), resistência à oxacilina (*mecA*) e à vancomicina (*vanA* e *vanB*), além de outros genes de importância epidemiológica em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.

No entanto, é importante ressaltar que a presença de genes de resistência adquiridos não significa necessariamente que estes genes estão sendo expressos. Em algumas situações, é possível detectar a presença destes genes em amostras sensíveis ao antimicrobiano. Portanto, seus resultados devem ser correlacionados com testes fenotípicos *in vitro*.

Por outro lado, para a avaliação da resistência aos antimicrobianos associada a mutações em genes cromossômicos, como a hiperexpressão de bombas de efluxo, a resistência às polimixinas associada a mutações em *mgrB*, *phoPQ*, *pmrAB*, é necessário realizar a amplificação e o sequenciamento do gene envolvido e/ou avaliar a expressão deste gene.

6.1.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A técnica de PCR se baseia na replicação do DNA que é o processo no qual a enzima DNA polimerase sintetiza uma nova cópia de DNA a partir de uma fita molde. É uma metodologia rápida e muito sensível, onde a região de interesse no genoma (ex.: gene de resistência) é copiada milhares ou milhões

de vezes, sendo possível detectar quantidades muito pequenas de DNA alvo na amostra^{1,2,3}.

Na PCR, para que o DNA alvo seja amplificado e visualizado, é necessário uma série de ciclos com variações de temperatura. Geralmente, cada ciclo consiste de três etapas com diferentes temperaturas: na primeira etapa, ocorre a desnaturação do DNA em temperaturas muito altas (> 90°C); na segunda etapa, ocorre o anelamento dos iniciadores necessários para a síntese da nova fita de DNA, geralmente em temperaturas médias (37-60°C) e; na terceira etapa, ocorre a extensão da cadeia nucleotídica pela ação da enzima DNA polimerase a 72°C. Esses ciclos são realizados em um equipamento chamado termociclador^{1,2}.

Antes de começar a reação de amplificação, é necessária a obtenção do DNA molde, o qual deverá ser extraído do isolado bacteriano que queremos investigar. O ideal é que o DNA esteja livre de impurezas (proteínas, lipídeos, RNA, etc.). Contudo, em algumas situações é possível fazer a reação de PCR a partir da colônia bacteriana diretamente¹.

⇒ **Extração do DNA**

A extração de DNA é um procedimento amplamente utilizado para a realização de análises moleculares. Existe uma série de metodologias de extração, que se baseiam na lise celular mecânica ou química.

A extração por lise mecânica provoca o rompimento do envoltório celular, incluindo a membrana externa, a parede celular e a membrana celular, expondo o DNA da bactéria. Nesse tipo de extração, se obtém um lisado bacteriano contendo o DNA e restos celulares. Apesar de o produto final não ser um DNA totalmente livre de impurezas, esta é a extração mais utilizada para PCR, devido à sua simplicidade de execução e eficiência. São exemplos de técnicas para extração de DNA por lise mecânica: fervura, sonicação (ultrassom), agitação com microesferas de vidro, maceração e nitrogênio líquido^{1,2}.

Por outro lado, na extração por lise celular química, se obtém um DNA mais purificado. Essa extração envolve várias etapas, quais sejam: remoção de lipídeos de membrana para desorganizar a bicamada lipídica (no caso das bactérias Gram-negativas) e solubilização das proteínas (detergentes e surfactantes); ação enzimática (lisozimas, proteases, RNAses) e precipitação do DNA com álcool (etanol ou isopropanol). Também é possível utilizar alguns agentes caotrópicos, como isotiocianato de guanidina, iodeto de sódio, cloreto de lítio (função: desnaturar proteínas, reduzir atividade enzimática, dis-

solter cápsulas e envelopes de células ricas em lipídios). Existem vários *kits* comerciais para a extração do DNA bacteriano através de lise química, os quais permitem a obtenção de DNA purificado^{1,2}.

⇒ **Reagentes necessários para a reação de PCR**

Após ter extraído o DNA, é possível realizar a PCR. A síntese das novas cópias do DNA durante a PCR ocorre pela ação de uma enzima DNA polimerase especial, que é estável em temperaturas muito elevadas. Assim, essa enzima não se desnatura durante as diferentes etapas da PCR. Esta enzima é chamada de *Taq* DNA polimerase e recebe este nome pois foi isolada pela primeira vez a partir de uma bactéria termófila (*Thermus aquaticus*).

A *Taq* DNA polimerase só é capaz de começar a adicionar nucleotídeos a um grupo 3'-OH preexistente; por isso é necessário colocar na reação de amplificação um par de iniciadores (*primers*), que são oligonucleotídeos complementares às extremidades da região do DNA que será amplificada. Um iniciador se liga numa fita de DNA molde no sentido 5'-3' (denominado *sense* ou *forward*) e o outro iniciador se liga na outra fita no sentido 3'-5' (denominado *antisense* ou *reverse*). Esses iniciadores irão se ligar às fitas de DNA molde e permitirão que a *Taq* DNA polimerase comece a sintetizar as novas fitas de DNA.

Além da *Taq* DNA polimerase e dos iniciadores, também são necessários (i) os nucleotídeos que serão utilizados para sintetizar um novo fragmento de DNA (dNTPs ou deoxinucleotídeo trifosfatados); (ii) cloreto de magnésio ($MgCl_2$), que é um cofator da enzima; (iii) tampão para manter as condições da reação estáveis para atividade da enzima; (iv) o DNA-molde; e (v) água estéril para completar o volume final.

⇒ **PCR**

Após o preparo da reação, esta será levada ao termociclador onde ocorrerão os ciclos de variação de temperatura e a amplificação do DNA. A cada ciclo, a quantidade de DNA alvo duplica, uma vez que os fragmentos gerados servem como molde para a etapa posterior.

Etapa de Desnaturação

Nessa etapa, a dupla fita de DNA molde é separada em fitas simples (desnaturada) através do aumento da temperatura próximo a 95°C. A temperatura vai depender da quantidade de citosina e guanina (C e G) presentes no frag-

mento de DNA alvo (quanto mais C e G, mais alta deverá ser a temperatura). Normalmente, 10 a 60 segundos são necessários para desnaturação da maioria dos DNA molde^{1,2}.

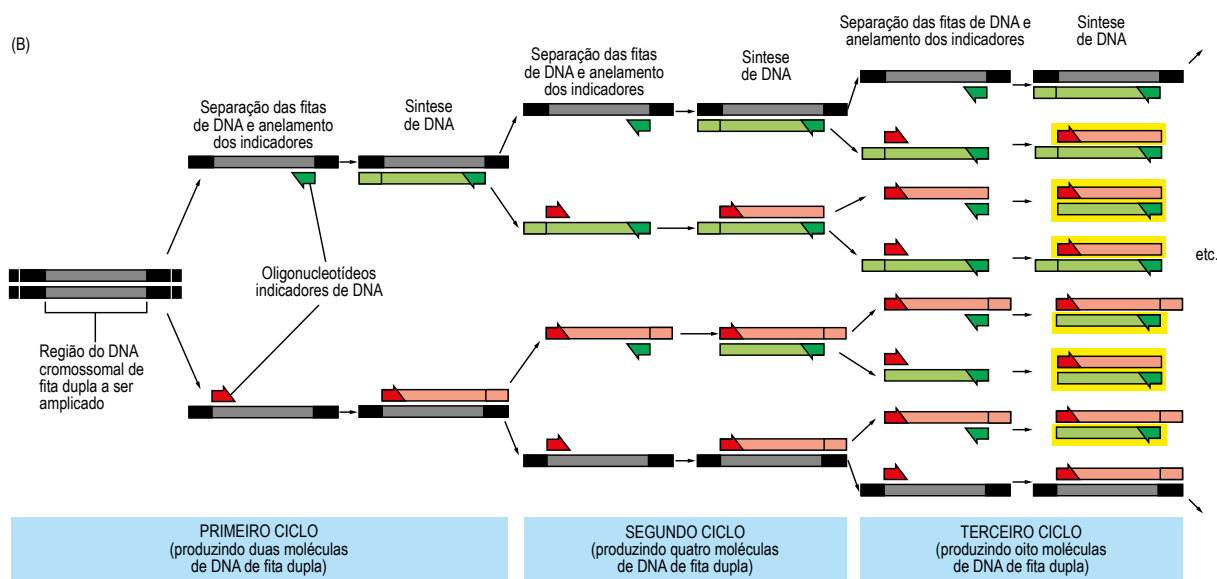
Etapa de Anelamento

O par de iniciadores (*primers*) é responsável pelo início da síntese de DNA, pois indica o local onde a *Taq* DNA polimerase irá atuar. Essas pequenas sequências flanqueadoras se anelam à extremidade 5' da região-alvo em cada fita simples do DNA molde, as quais foram separadas na etapa de desnaturação. Durante o anelamento, que dura aproximadamente 30 segundos, a temperatura encontra-se entre 37°C e 60°C. Quanto mais alta a temperatura, mais específico é o anelamento, e isso pode servir para eliminar bandas inespecíficas que possam aparecer no resultado final do processo da PCR. Entretanto, a temperatura de anelamento deve ser escolhida de acordo com conteúdo G+C dos iniciadores utilizados. O fragmento de DNA amplificado tem comprimento equivalente ao número de bases nucleotídicas presentes no intervalo entre os dois iniciadores^{1,2}.

Etapa de Extensão

A extensão é catalisada pela enzima *Taq* DNA polimerase, sendo a etapa mais longa da reação. Como a temperatura ótima na qual essa enzima apresenta atividade é 72°C, esta será mantida durante toda a etapa de extensão. A síntese do DNA (polimerização) irá ocorrer no sentido 5'-3', pois o iniciador está ligado à região 5' do fragmento a ser sintetizado. A enzima sempre vai continuar a sequência a partir da extremidade 3' do iniciador, sintetizando uma sequência complementar à sequência molde e gerando um fragmento de fita dupla de DNA, chamado de *amplicon*^{1,2}.

Essas etapas de desnaturação, anelamento e extensão são repetidas de 20 a 35 vezes, fazendo com que o DNA molde inicial seja amplificado e ao final dos ciclos serão obtidos milhares ou milhões de cópias da região-alvo do DNA que foi anelado com os iniciadores (Figura 1).



Fonte: Alberts *et al.* 2010, *Biologia Molecular da Célula*, 5ª ed³

Figura 1. Amplificação de DNA pela técnica de PCR.

⇒ Visualização

Após a reação, esses produtos amplificados serão submetidos a uma eletroforese em gel de agarose ou poliácridamida. Na eletroforese, os fragmentos de DNA são inseridos em uma matriz de gel e submetidos a um campo elétrico. Devido à carga negativa do DNA, este migra em direção ao polo positivo e os fragmentos de DNA são separados de acordo com seu peso molecular (quantidade de nucleotídeos). Os fragmentos de menor peso molecular migram mais rápido. Os fragmentos de mesmo peso molecular formam uma banda no gel, que será posteriormente marcada com substâncias que permitam sua visualização^{1,2}.

O método mais comum e mais usado para a detecção de DNA em géis de agarose é o uso do corante fluorescente brometo de etídeo. Esse composto se intercala na molécula de DNA através de forças de van der Waals. O brometo de etídeo pode detectar bandas contendo até 10 hg de DNA. Para fotografar o gel, é necessária luz UV transmitida ou emitida, usando aparelhos chamados transiluminadores, que são acoplados a uma câmera fotográfica e a um computador com *software* específico^{1,2}.

Apesar de o brometo de etídeo ser o marcador de DNA mais utilizado, existem alternativas menos tóxicas e mais seguras, visto que esse composto é intercalante de qualquer molécula de DNA, incluindo o humano. São exemplos de outros marcadores de DNA: SYBR Safe, Gel Red e Syber Gold. Esses corantes emitem fluorescência 100 vezes maior em relação ao brometo de

etéideo, devido à alta afinidade com o DNA, portanto, quantidades ainda menores de DNA podem ser detectadas (< 20 pg). No entanto, esses corantes alternativos são mais caros.

O tamanho dos amplicons gerados será estimado em comparação às bandas obtidas com o marcador de peso molecular e da amostra utilizada como controle positivo.

⇒ **Variações de PCR**

A partir da PCR convencional surgiram outras variantes da técnica que são bastante utilizadas na detecção de genes de resistência: PCR-Multiplex; RT-PCR; PCR em tempo real, dentre outras.

PCR-Multiplex

A PCR-Multiplex é uma reação na qual são adicionados dois ou mais pares de iniciadores em uma mesma reação. Logo, pode ser feita a detecção de mais de um gene no DNA a ser estudado com somente uma reação. É importante citar que, nessa técnica, as temperaturas de anelamento dos iniciadores devem ser bem próximas umas das outras para que ocorra a amplificação das regiões-alvo corretamente. Além disso, os amplicons devem ter tamanhos diferentes para que sejam diferenciados na corrida eletroforética. Essa técnica é muito utilizada para detecção de mais de um gene de resistência, como por exemplo a detecção de diferentes genes de carbapenemases em uma mesma reação. Uma de suas vantagens inclui o fato de se gastar menos material e tempo.

RT-PCR

A RT-PCR (“Reverse Transcriptase-PCR”) é utilizada para detectar qualitativamente níveis de expressão de RNA. O RNA alvo é convertido em DNA complementar (cDNA) através da ação da enzima transcriptase reversa e o cDNA é amplificado pela PCR tradicional. Essa técnica é muito utilizada para verificar a expressão de genes, como, por exemplo, para a avaliação da expressão de bombas de efluxo ou de porinas⁴.

PCR em tempo real

A técnica de PCR em tempo real (“Real-time PCR”) é um método semiquantitativo (q-PCR) muito sensível e rápido. Nessa metodologia, não é necessário submeter os *amplicons* gerados a uma corrida eletroforética. Sua detecção

ocorre simultaneamente à amplificação. O fragmento de DNA gerado é identificado por emissão de fluorescência, que é medida a cada ciclo e cuja intensidade é correspondente à quantidade de DNA amplificado. Existem duas estratégias para emitir fluorescência: a adição de um corante como o SYBR Green à reação, que se liga ao DNA de dupla fita de maneira inespecífica, ou a adição de sondas específicas para o DNA alvo marcadas com fluoróforos repórteres. Para a detecção da fluorescência emitida, é necessário um equipamento que contenha um termociclador acoplado a um sistema ótico para a excitação e captura da emissão da fluorescência, além de um computador para aquisição de resultados e análise final da reação⁴.

As vantagens da q-PCR incluem a detecção de pequenas quantidades de DNA na amostra, a quantificação de sequências de DNA alvo em diferentes matrizes, maior rapidez na obtenção do resultado, além de diminuir o risco de contaminação cruzada por não ser necessária nenhuma outra manipulação da amostra após a amplificação⁴.

Atualmente existem protocolos e *kits* comerciais de PCR em tempo real para identificar alguns patógenos e genes de resistência de importância médica. É possível realizar um PCR multiplex usando a plataforma de PCR em tempo real, permitindo a detecção de mais de um gene na mesma reação de forma rápida e específica. Para esse tipo de reação, usam-se iniciadores e sondas específicas para cada gene de interesse e as sondas são marcadas com fluoróforos diferentes⁴.

Análise da curva de dissociação através de PCR em tempo real

A técnica de análise de curva de dissociação (HRM, *High Resolution Melting Analysis*) é um método de análise pós-PCR em tempo real que permite identificar variações na sequência de nucleotídeos do DNA amplificado através da análise da temperatura de dissociação ou temperatura de *melting* (T_m). A T_m é a temperatura na qual 50% do DNA está na forma de fita simples e a outra metade em fita dupla. Essa temperatura se modifica de acordo com o conteúdo G+C do fragmento de DNA amplificado⁵.

Para a detecção das variações de T_m , utiliza-se intercalantes de DNA fluorescentes (por exemplo, EvaGreen, Syber Green) que se ligam especificamente a DNAs de fita dupla. Assim, após a reação de qPCR, há um alto nível de fluorescência no tubo de reação devido a presença de milhões de cópias de DNA em fita dupla. Submetem-se então estes amplicons gerados na PCR a um aumento gradual de temperatura e à medida que estes amplicons são aquecidos, as fitas de DNA vão se separando e a fluorescência vai diminuindo. O

equipamento de PCR em tempo real registra a intensidade de fluorescência e plota um gráfico conhecido como curva de dissociação, mostrando o nível de fluorescência *versus* a temperatura⁵.

Essa técnica é bastante sensível, podendo detectar desvios de T_m derivados da modificação de um único nucleotídeo (SNP, “Single Nucleotide Polymorphism”). Assim, é possível utilizar essa metodologia para detectar mutações em genes de resistência, identificar variantes alélicas ou ainda detectar mais de um gene simultaneamente (qPCR multiplex). Neste tipo de qPCR multiplex com análise HRM, não são utilizadas sondas específicas para cada gene, mas os iniciadores de cada gene devem ser desenhados de forma que tenham temperaturas de dissociação (T_m) diferentes, pelo menos em 2°C, para evitar a sobreposição de picos e permitir a detecção de cada um dos genes investigados⁵.

6.1.2 Sequenciamento de DNA: Método de Sanger

O sequenciamento de DNA pode ser uma ferramenta para avaliar a presença de mutações em genes cromossômicos que estejam relacionados à resistência aos antimicrobianos, identificar variantes alélicas de genes adquiridos e identificar o contexto genético em que os genes adquiridos estão inseridos, como plasmídeos, integrons ou transposon^{6,7}.

Dentre as metodologias de sequenciamento disponíveis atualmente, o método proposto por Frederic Sanger e colaboradores, em 1977, é o que gera resultados com maior facilidade de interpretação, tem custo relativamente baixo e é bastante utilizado para sequenciar fragmentos pequenos de DNA^{6,7}.

O sequenciamento de Sanger é conhecido como método de terminação de cadeia ou método dos dideoxynucleotídeos. Essa metodologia mimetiza uma reação de PCR, onde são colocados o DNA molde (geralmente *amplicons* obtidos a partir de uma reação de PCR), a *Taq*DNA polimerase, os iniciadores específicos para a região de interesse e os nucleotídeos. Contudo, além dos deoxinucleotídeos trifosfatados usuais (dNTPs), são adicionados dideoxynucleotídeos (ddNTPs) à reação. Esses ddNTPs não possuem o radical hidroxila (OH) ligada ao carbono 3' da pentose (Figura 2). Assim, quando um desses nucleotídeos é inserido na nova fita, a síntese do DNA é interrompida, pois a *Taq*DNA polimerase não consegue inserir um novo nucleotídeo^{6,7}.

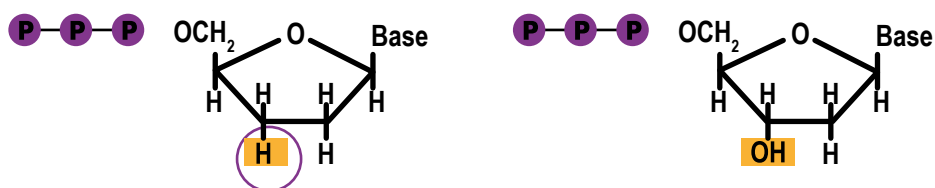


Figura 2. Moléculas de dideoxynucleotídeos (ddNTPs) e deoxynucleotídeos (dNTPs).

Atualmente, se utiliza uma detecção automatizada da sequência de nucleotídeos obtida, onde cada ddNTP é marcado com um fluoróforo distinto e a sequência de nucleotídeos marcados é identificada num sequenciador automático. A separação dos fragmentos é realizada por eletroforese capilar⁷. Os fragmentos de DNA marcados com os fluoróforos migram ordenadamente de acordo com seu tamanho no interior dos capilares. São excitados por um feixe de laser e emitem colorações distintas que permitem a identificação das quatro bases nitrogenadas. A informação é transmitida para um computador e, ao final da corrida, obtemos um eletroferograma correspondente à sequência de bases dos fragmentos de interesse^{6,7} (Figura 3).

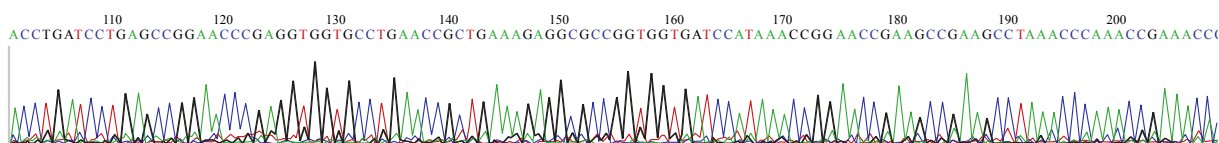


Figura 3. Exemplo de eletroferograma de sequenciamento de fragmento de DNA bacteriano.

A análise da sequência de nucleotídeos gerada pode ser realizada através de um alinhamento da sequência com um DNA de referência. Assim, é possível observar as identidades e diferenças nas sequências nucleotídicas, podendo determinar a variante alélica ou observar a presença de mutações, inserções ou deleções em um determinado gene que podem estar associadas ao desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos^{6,7}.

Existem algumas ferramentas disponíveis na internet para a realização deste alinhamento, como por exemplo, o BLAST (“Basic Local Alingment Sequence Tool”) na plataforma do NCBI (“National Center for Biotechnology Information”) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e o CLUSTAL W (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>).

6.2 Métodos para avaliação da epidemiologia molecular de bactérias multirresistentes

A avaliação da diversidade genética entre os isolados bacterianos multirresistentes aos antimicrobianos é fundamental para a caracterização de surtos de infecção, avaliação de possíveis fontes de transmissão e aquisição desses patógenos, além da observação da prevalência de grupos clonais em determinados locais, visando o monitoramento da emergência e disseminação de bactérias multirresistentes^{9,10,11,12}.

Os métodos de tipagem molecular são os mais recomendados para estudos epidemiológicos, pois são menos sujeitos a variações que os métodos fenotípicos e apresentam maior poder discriminatório, maior reprodutibilidade e, em alguns casos, permitem o estabelecimento de bancos de dados. Existem quatro gerações de métodos de tipagem molecular. Um dos primeiros métodos utilizados foi a análise do perfil plasmidial, depois vieram os métodos envolvendo o uso de enzimas de restrição (RFLP, “Restriction Fragment Length Polymorphism”) e de sondas genéticas (Ribotipagem). Outra metodologia amplamente utilizada para tipagem molecular é a técnica de macrorrestrição de DNA seguida de eletroforese em campo pulsado (PFGE, “Pulsed-Field Gel Electrophoresis”). Métodos baseados em amplificação por PCR de genes *housekeeping* seguida de sequenciamento desses genes (por exemplo: MLST, “Multilocus Sequence Typing”) também são utilizados como técnicas de tipagem molecular. Atualmente, é possível avaliar a diversidade genética através de abordagens baseadas no sequenciamento do genoma total⁷.

6.2.3 Metodologias baseadas em padrões de bandas: macrorrestrição de DNA seguida de PFGE

Os métodos de tipagem de isolados bacterianos baseados no perfil de bandas geralmente envolvem a fragmentação de DNA cromossômico pela digestão com enzimas de restrição. Estas enzimas reconhecem precisamente uma região específica no DNA e clivam em uma sequência definida. A utilização de enzimas de restrição de ação rara no DNA gera um número relativamente pequeno de fragmentos de alto peso molecular, cerca de 10Kbp–1Mbp (macrorrestrição), os quais necessitam de um sistema de eletroforese pulsada (PFGE) para serem separados e gerar um padrão de bandas distinto. Devido ao seu alto poder discriminatório e boa reprodutibilidade, a macrorrestrição de DNA seguida de PFGE é o método baseado em padrões de bandas mais utilizado para tipagem molecular de bactérias.

⇒ Extração de DNA cromossômico

Para essa metodologia, é necessário que o DNA cromossômico bacteriano esteja livre de impurezas e intacto, ou seja, sem que ocorram quebras ines-

pecíficas. Para isso, as células bacterianas são aprisionadas em blocos de agarose aonde ocorrerá a lise celular, digestão da parede celular e de proteínas, restando apenas o DNA íntegro que será submetido à digestão pela enzima de restrição.

⇒ **Corrida eletroforética**

Em uma eletroforese convencional, os fragmentos de DNA com alto peso molecular (superior a 20 Kbp) migram com a mesma mobilidade, por isso nenhuma separação dessas bandas pode ser observada. Como os fragmentos gerados por enzimas de ação rara no cromossomo superam esse peso molecular, é necessário fazer uma eletroforese com alternância de orientação do campo elétrico para que as moléculas consigam migrar adequadamente pela agarose. Essas alternâncias de orientação do campo elétrico causam alterações na estrutura dos fragmentos, que, por sua vez, se alongam e se contraem alternadamente. O tempo para que ocorram essas modificações estruturais varia de acordo com o peso molecular, para tanto, a duração do pulso elétrico em determinada orientação e o tempo da corrida eletroforética devem ser padronizados para cada espécie, de acordo com o tamanho dos fragmentos de DNA esperados.

Para realizar essa eletroforese, o equipamento mais utilizado é o “CHEF DRIII” (Biorad), que possui uma cuba de eletroforese com eletrodos dispostos hexagonalmente permitindo a alternância da direção do campo elétrico com gradiente de voltagem constante no gel.

⇒ **Análise dos dados**

Após corrida eletroforética, os fragmentos de DNA são marcados com intercalantes de DNA, como brometo de etídio e é feita a observação dos perfis eletroforéticos, através de uma inspeção visual e uma análise automatizada. A análise automatizada permite relacionar os perfis de fragmentação através de um dendograma.

Para a avaliação de surtos, Tenover e colaboradores (1995)¹³ estabeleceram alguns critérios de interpretação dos perfis de bandas gerados no PFGE: isolados pertencentes a um mesmo surto ou epidemia apresentam perfis de fragmentação do DNA cromossômico indistinguíveis; um isolado bacteriano é considerado intimamente relacionado a outro, provavelmente fazendo parte do surto, quando ocorre apenas um evento genético (mutação, deleção, inserção e rearranjos) que gera de uma a três bandas de diferença no perfil de fragmentação; microrganismos são considerados possivelmente

relacionados, quando os isolados se diferenciam por quatro bandas (que representam dois eventos genéticos independentes). Isolados com diferenças de mais de cinco bandas (sugestivo de mais de três eventos genéticos) são ditos como não relacionados e não pertencentes ao mesmo surto. Essa e outras definições, no entanto, devem ser apenas um dos componentes de uma avaliação epidemiológica, onde uma análise acurada deve incluir todos os dados clínicos disponíveis¹³.

6.2.4 Técnicas baseadas em sequenciamento de genes: MLST

As técnicas de sequenciamento de genes *housekeeping* podem ser utilizadas para estudos de diversidade genética das bactérias. Essas técnicas possuem a vantagem de serem baseadas em dados não ambíguos, ou seja, sequências únicas de DNA, sendo mais fácil a interpretação quando comparadas com os métodos que envolvem padrões de bandas. Além disso, são bastante reprodutíveis, independentemente dos equipamentos e *kits* comerciais de amplificação e sequenciamento utilizados. Os dados gerados pelas técnicas de sequenciamento de genes *housekeeping* podem ser depositados em bancos de dados, e assim, serem comparados com resultados obtidos em diferentes laboratórios em todo o mundo¹⁴.

MLST é uma técnica que se baseia na amplificação e sequenciamento de genes conservados entre os isolados de uma mesma espécie, onde as mutações pontuais (SNPs) são acumuladas de maneira mais lenta. Dessa forma, essa metodologia é adequada para estudos filogenéticos, para investigações epidemiológicas de longos períodos e de isolados não relacionadas geograficamente, enquanto que a macrorrestrrição de DNA seguida de PFGE é mais utilizada para investigações de surtos locais¹⁴.

Existem esquemas de MLST descritos para diversas bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, e o número de genes incluídos é variável de acordo com a espécie. Por exemplo, nas espécies *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* são sete genes incluídos no esquema. Assim, nessa metodologia, um fragmento interno de aproximadamente 450-500 bp de cada um dos genes é sequenciado e a sequência encontrada é comparada com as depositadas no banco de dados. Para cada sequência diferente de cada gene, é dado um número de alelo. Assim, a combinação dos números de alelos de cada gene gera o ST (“Sequence Type”), que pode ser comparado com os STs já descritos em bancos de dados. Os bancos de dados que contêm o maior número de espécies e isolados são os curados pelo Instituto Pasteur – Paris, França (www.pasteur.fr/mlst) e o banco Pub-MLST, disponível no site <http://pubmlst.org/>.

Através dessa metodologia, e com a ajuda dos bancos de dados, já foi possível identificar alguns clones multirresistentes circulantes mundialmente. O clone ST131 de *E. coli* tem sido associado a disseminação da ESBL CTX-M-15 em diferentes partes do mundo⁸. A disseminação da carbapenemase KPC em isolados de *K. pneumoniae* também tem sido associada a um complexo clonal, o CC258, que já foi descrito nas Américas, na Europa e na Ásia, e alguns dos STs pertencentes a esse complexo clonal (ST437 e ST11) têm sido considerados os mais prevalentes circulando no Brasil carregando o gene *bla*_{KPC}. Um complexo clonal é formado por STs filogeneticamente bem próximos, com diferenças em apenas um ou dois genes analisados no MLST (dependendo da espécie). Em *A. baumannii*, os complexos clonais CC109 e CC92, inicialmente encontrados na Europa, denominados de clone epidêmico global (GC) 1 e 2 respectivamente, têm sido observados em diferentes partes do mundo. O mesmo também tem sido observado para MRSA, a maioria dos clones epidêmicos pertence a oito principais complexos clonais CC1, CC5, CC8, CC22, CC30, CC45, CC59 and CC80¹⁰.

6.2.5 Técnicas baseadas em Sequenciamento de Nova Geração

O sequenciamento de Sanger foi uma das primeiras metodologias propostas para o sequenciamento de DNA e tem sido extensivamente utilizada para determinação de alelos de genes. Isso significa que apenas uma pequena fração do genótipo de um indivíduo, usualmente aqueles genes que foram selecionados, é avaliada. Com o intuito de superar essa problemática, as novas metodologias de sequenciamento em massa de DNA têm sido utilizadas para diferenciação dos isolados. Todas as metodologias de sequenciamento do genoma total que surgiram após o método de Sanger são chamadas de Sequenciamento de Nova Geração (NGS, “New Generation Sequencing”)¹⁵.

A primeira geração de sequenciadores era composta pela automatização do sequenciamento de Sanger, com a plataforma ABI 3700, o primeiro sequenciador utilizando eletroforese capilar. Na segunda geração de sequenciadores destacam-se as plataformas 454 da Roche, IonTorrent da Life Technologies e MiSeq/HiSeq da Illumina, baseadas nas metodologias de pirosequenciamento, alteração de pH e sequenciamento em ponte, respectivamente, sendo que o mais utilizado atualmente é o MiSeq da Illumina.

A tecnologia 454 que, conforme mencionado, utiliza a metodologia de pirosequenciamento, se difere do [método de Sanger](#) pelo fato de que se baseia na detecção da liberação de pirofosfato quando ocorre a incorporação de nucleotídeos, ao invés da terminação da cadeia com dideoxynucleotídeos. O DNA total é fragmentado e, em seguida, sequências adaptadoras são ligadas nas extremidades. O DNA então é amplificado em *beads* microscópicas, atra-

vés de PCR em emulsão. Nessa tecnologia, a síntese de DNA é mediada pelas enzimas (ATP sulfúrilase e luciferase) e os substratos (adenosina 5' fosfosulfato e luciferina). Durante a adição de um nucleotídeo, o grupo pirofosfato é liberado e gera a produção de luz detectável¹⁵.

O IonTorrent é um pHmetro de DNA. Através de chips semicondutores, o equipamento é capaz de detectar a alteração mínima de pH pela liberação de íons de hidrogênio (H⁺) toda vez que a DNA polimerase insere um nucleotídeo e o sinal químico é transformado em digital. Esta técnica elimina o uso de nucleotídeos marcados e lasers. O DNA total é fragmentado, ligado a uma *bead* e inseridas nos poços do *chip*, todos os reagentes para polimerização da cadeia de DNA são adicionados à reação e a liberação de H⁺ é captada sempre que um nucleotídeo diferente é inserido. Para isso, é adicionado um nucleotídeo por vez, A, T, C ou G. Se o nucleotídeo não for adicionado, não ocorre alteração de pH e ele é retirado da reação, que logo em seguida insere o próximo nucleotídeo¹⁵.

Os equipamentos MiSeq e HiSeq baseiam-se no sequenciamento através de PCR em ponte. Inicialmente, o DNA total é fragmentado e, a esse DNA, são ligados adaptadores (um diferente em cada uma das extremidades, 5' e 3'), que permitem a fixação dos fragmentos de DNA à placa de sequenciamento, onde se encontram adaptadores complementares fixados. Após o anelamento, uma estrutura em ponte é formada. Os nucleotídeos marcados com fluoróforos distintos são inseridos pela DNA polimerase e a leitura do sinal da fluorescência é captada. Após o término do primeiro ciclo, essa estrutura em ponte é desfeita. Subsequentemente, 35 ciclos são repetidos, o que gera aproximadamente mil cópias de cada fragmento, formando um *cluster*. A leitura da sequência de bases é realizada através da análise sequencial das imagens capturadas em cada ciclo. A plataforma MiSeq gera até 7 gigabases de dados em cada corrida, o que a torna mais adequada ao estudo de genomas bacterianos. Já a plataforma HiSeq é mais robusta, possibilitando a geração de 300 gigabases de dados, para cada corrida e tem sido utilizada para o sequenciamento de genomas maiores e mais complexos, como o genoma humano¹⁵.

A terceira geração de sequenciadores é composta pela metodologia de molécula única em tempo real, do inglês “Single-Molecule Real-Time” (SMRT), desenvolvida pela Pacific BioSciences (PacBio), podendo ser chamada de sequenciamento SMRT ou sequenciamento PacBio. A reação ocorre em uma célula contendo cerca de 150.000 poços, que são chamados de “Zero-Mode Wave guides” (ZMWs). O DNA alvo é fragmentado e ligado a adaptadores que transformam as fitas em moldes circulares, para que então ocorra o se-

quenciamento. Para o sequenciamento, são utilizados a DNA polimerase e os nucleotídeos marcados fluorescentemente. A fluorescência é detectada por um laser na parte inferior de cada ZMWs, sendo a leitura mostrada em tempo real¹⁵.

A quarta geração de sequenciadores é composta pelo Nanopore da Oxford (sequenciamento por nanoporos). Este sequenciador tem a vantagem de ser portátil, o que permite sua utilização em qualquer lugar ou ambiente, pesa cerca de 100 gramas e tem entrada USB para computador. Essa metodologia baseia-se na leitura de uma molécula de DNA conforme esta atravessa o nanoporo. O DNA é colocado em uma membrana que possui os nanoporos. É aplicada uma diferença de potencial entre os dois lados da membrana gerando uma corrente iônica que passa pelos poros e é medida por sensores do aparelho. A cada base nucleotídica que passa pelo poro é detectada uma alteração na amperagem, que é característica de cada base, permitindo o sequenciamento. Teoricamente, através dessa metodologia, é possível identificar todas as bases de uma molécula inteira.

O sequenciamento total do genoma (STG) bacteriano tem se tornado uma chave poderosa para investigações epidemiológicas, pois permite acessar várias informações de forma rápida e eficiente. Todas as metodologias fornecem milhares de informações sobre o microrganismo em questão. Através desses dados, é possível procurar por mecanismos de resistência cromossômicos ou carregados em elementos genéticos móveis; comparar as plataformas genéticas responsáveis por essa disseminação; detectar genes de virulência e; determinar a similaridade genética entre dois isolados¹⁶.

Entretanto, essas metodologias fornecem vários fragmentos de DNA (*reads*) que necessitam ser unidos em uma sequência maior, porém os genomas bacterianos possuem grande quantidade de sequências repetidas (como elementos genéticos móveis), o que dificulta a montagem pela sobreposição destas regiões. Assim, muitas vezes, a união dos fragmentos obtidos acaba gerando mais de uma sequência final (chamados de *contigs*). Após gerar os contigs, é necessário encontrar os genes dentro do genoma através da etapa de anotação gênica. Essa etapa inclui também a determinação da função desses genes. Os resultados de cada etapa precisam passar por um processo de curadoria, para validar os resultados obtidos. Para cada etapa existe uma ferramenta computacional específica, que em sua maioria são disponíveis para utilização no sistema operacional Linux^{7,8,15}.

6.3 Referências bibliográficas

1. Lorenz TC. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *J Vis Exp*. 2012; (63): 3998.
2. Polymerase Chain Reaction (PCR). National Center for Biotechnology Information, NCBI. Disponível em (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/>)
3. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologia Molecular da Célula*. Traduzido por Ana Letícia Vaz. 5 ed. Artmed. 2010.
4. Kralik P, Ricchi MA. Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. *Front Microbiol*. 2017; 8:108.
5. Pettersson E, Lundeberg J, Ahmadian A. Generations of sequencing technologies. *Genomics*. 2009; 93(2):105-11.
6. Didelot X, Bowden R, Wilson D, Peto TE, Crook D. Transforming clinical microbiology with bacterial genome sequencing. *Nat Rev Genet*. 2012;13(9):601-12.
7. Swerdlow H, Wu SL, Harke H, Dovichi NJ. Capillary gel electrophoresis for DNA sequencing. Laser-induced fluorescence detection with the sheath flow cuvette. *J Chromatogr*. 1990; 516(1):61-7.
8. Banerjee R, Johnson Jr. A New Clone Sweeps Clean: The Enigmatic Emergence of *Escherichia coli* ST131. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014; 58(9):4997-5004.
9. Boswihi S, Udo E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an update on the epidemiology, treatment options and infection control. *Curr Med Res Pract*. 2018; 8:18-24.
10. Li W, Raoult D, Fournier P. Bacterial strain typing in the genomic era. *FEMS Microbiol Rev*. 2009; 33: 892–916.
11. Thomson N, Weill FX, Holt KE. Genomic insights into the emergence and spread of antimicrobial-resistant bacterial pathogens. *Science*. 2018; 360(6390):733-738.
12. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1997;18(6):426-39.
13. Maiden MC, Bygraves J, Feil E, Morelli G, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant Da, Feavers I, Achtman M, Spratt B. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(6):3140-5.
14. Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol*. 2008; 26(10):1135-45.

Vídeos Ilustrativos

Com o objetivo de facilitar a compreensão das principais técnicas laboratoriais descritas neste módulo, estão apresentados a seguir vídeos ilustrativos, correspondentes a cada capítulo.

- **Capítulo 4:**

Disco difusão

Autoria: EUCAST

Descrição: Apresenta-se aqui a metodologia de disco difusão (Kirby-Bauer), para a realização do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos. Os vídeos incluem detalhes sobre a preparação do inóculo, a inoculação das placas, a aplicação dos discos e a incubação das placas. Além disso, orienta como fazer a leitura das zonas de inibição e a interpretação dos resultados.

Link para acesso: https://www.youtube.com/watch?v=GXIpwj5f11k&list=PLQU_kWRWBld694u9cLr4asinonWSzr9Rf&index=6

Microdiluição em Caldo

Autoria: Prof. Dr. Marcelo Pilonetto – Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN/PR) e Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR)

Descrição: Apresenta-se aqui a metodologia de preparo, inoculação e leitura de placas de microdiluição em caldo, conforme as orientações do EUCAST/BrCAST, para determinar a susceptibilidade à Polimixina B. O ouvinte deve estar atento para o fato

de que, embora baseado em recomendações padronizadas, pode haver variações na metodologia como o uso de vidrarias, pipetas, volumes e descartáveis alternativos aos aqui apresentados.

Link para acesso: <https://youtu.be/QwHk6VM1leo>

- **Capítulo 5:**

Teste fenotípico colorimétrico de detecção de carbapenemases: CarbaNP

Autoria: Dra. Ana Paula D' Alincourt Carvalho Assef e Dr. Cláudio Marcos Rocha de Souza – Instituto Oswaldo Cruz

Descrição: Apresenta-se o passo a passo para a execução do teste colorimétrico CarbaNP que é um teste fenotípico rápido para detecção da produção de carbapenemases em Enterobactérias e *Pseudomonas* e baseia-se na visualização da hidrólise do imipenem pela carbapenemase através da alteração do pH e consequente mudança da cor do indicador de pH vermelho de fenol. Para este teste, é necessária uma lise celular prévia.

Link para acesso: https://youtu.be/t_sQslieNuU

Teste fenotípico colorimétrico de detecção de carbapenemases: BlueCarba

Autoria: Dra. Ana Paula D' Alincourt Carvalho Assef e Dr. Cláudio Marcos Rocha de Souza – Instituto Oswaldo Cruz

Descrição: Apresenta-se o passo a passo para a execução do teste colorimétrico BlueCarba que é um teste fenotípico rápido para a detecção da produção de carbapenemases em Enterobactérias e *Pseudomonas*. Este teste é um derivado do teste Carba NP e baseia-se na visualização da hidrólise do imipenem pela carbapenemase através da alteração do pH e consequente mudança da cor do indicador de pH azul de bromotimol. Diferente do CarbaNP, o Blue carba não necessita de lise bacteriana prévia.

Link para acesso: <https://youtu.be/g0NNxy4lbgj>

Teste fenotípico colorimétrico de detecção da resistência às polimixinas: Rapid polymyxin NP test

Autoria: Dra. Ana Paula D' Alincourt Carvalho Assef e Dr. Cláudio Marcos Rocha de Souza – Instituto Oswaldo Cruz

Descrição: Apresenta-se o passo a passo para a execução do teste colorimétrico Rapid polymyxin NP test que é um teste fenotípico de detecção rápida da resistência às polimixinas em Enterobactérias. Este teste baseia-se na detecção do crescimento bacteriano na presença de colistina através da observação da metabolização da glicose, com alteração do pH e consequente mudança de cor do indicador de pH vermelho de fenol.

Link para acesso: <https://youtu.be/T5Bjl82Gk2o>

mCIM, eCIM e sCIM

Autoria: Prof. Dra. Andreza Francisco Martins e Otávio von Ameln Lovison – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Descrição: Neste vídeo estão apresentados os procedimentos para a realização das técnicas MCIM, ECIM e SCIM utilizadas para a pesquisa de carbapenemases. Detalham-se todas as etapas de desenvolvimento metodológico e interpretação dos resultados. O ouvinte deve estar atento para o fato de que, embora baseado em recomendações padronizadas, pode haver variações na metodologia como o uso de vidrarias, pipetas e descartáveis alternativos aos aqui apresentados.

Link para acesso: <https://youtu.be/-dvNmLepHFc>

Detecção de carbapenemases através da utilização de inibidores enzimáticos

Autoria: Prof. Dra. Andreza Francisco Martins e Otávio von Ameln Lovison – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Descrição: Neste vídeo estão apresentados os procedimentos para a realização da pesquisa de carbapenemases utilizando inibidores/potenciadores enzimáticos: ácido fenilborônico, EDTA e cloxacilina. Detalham-se todas as etapas de desenvolvimento metodológico e interpretação dos resultados. Indica-se bibliografia complementar para consulta, especialmente no preparo dos insumos. O ouvinte deve estar atento para o fato de que, embora baseado em recomendações padronizadas, pode haver variações na metodologia como o uso de vidrarias, pipetas e descartáveis alternativos aos aqui apresentados.

Link para acesso: <https://youtu.be/SY7dPNQICNk>

- **Capítulo 6:**

PCR multiplex convencional para a detecção de genes de carbapenemases

Autoria: Dra. Ana Paula D' Alincourt Carvalho Assef e Dr. Cláudio Marcos Rocha de Souza – Instituto Oswaldo Cruz

Descrição: Apresenta-se o passo a passo para a execução da técnica de PCR multiplex convencional para a detecção de três genes de carbapenemases (*bla*_{KPC}, *bla*_{NDM} e *bla*_{OXA-48}), desde a extração do DNA até a visualização dos produtos amplificados. Este teste pode ser usado para a detecção de genes de carbapenemases assim como outros genes de resistência de interesse epidemiológico, e baseia-se na amplificação *in vitro* de fragmentos específicos de DNA.

Link para acesso: https://youtu.be/WQw-u-7aR_k

PCR em tempo real (qPCR)

Autoria: Prof. Dr. Marcelo Pillonetto – Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN/PR) e Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR)

Descrição: Metodologia aplicada para a pesquisa genotípica de genes de resistência por técnicas moleculares. Foi utilizado, a título de exemplo, a pesquisa dos genes de carbapenemases, que codificam as enzimas KPC, NDM e o gene de resistência móvel à colistina, *mcr-1*. O ouvinte deve estar atento para o fato de que, embora baseado em um protocolo oficial (CDC), pode haver variações na metodologia como volume de reagentes e equipamentos, uso de vidrarias, pipetas e descartáveis alternativos aos aqui apresentados.

Link para acesso: <https://youtu.be/B-cEFNwax1A>



**Acesse o site
da ANVISA**

Baixe o leitor de QR
Code em seu celular e
fotografe este código



Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa
SIA Trecho 5 - Área especial 57 - Lote 200
CEP: 71205-050
Brasília - DF
Telefone: 61 3462 6000

www.anvisa.gov.br
www.twitter.com/anvisa_oficial
Anvisa Atende: 0800-642-9782
ouvidoria@anvisa.gov.br