

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS QUÍMICAS, FARMACÊUTICAS E DE ALIMENTOS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E BIOPROSPECÇÃO**



Dissertação

**Estudos epidemiológicos de bactérias multirresistentes na cidade de Pelotas e  
suscetibilidade à diidropirimidinona**

**Marisa Castro Jara**

Pelotas, 2019

**Marisa Castro Jara**

**Estudos epidemiológicos de bactérias multirresistentes na cidade de Pelotas e  
suscetibilidade à diidropirimidinona**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Bioquímica e Bioprospecção).

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Patrícia da Silva Nascente

Pelotas, 2019

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

J37e Jara, Marisa Castro

Estudos epidemiológicos de bactérias multirresistentes na cidade de Pelotas e suscetibilidade à diidropirimidinona / Marisa Castro Jara ; Patrícia da Silva Nascente, orientadora. — Pelotas, 2019.

94 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. Bactérias multirresistentes. 2. Infecções hospitalares. 3. Antibióticos. 4. Epidemiologia. 5. Diidropirimidinonas. I. Nascente, Patrícia da Silva, orient. II. Título.

CDD : 574.192

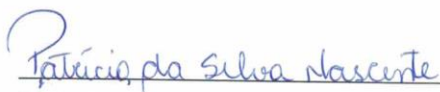
Marisa Castro Jara

Marisa Castro Jara

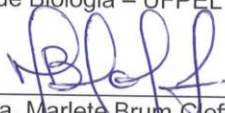
Estudos epidemiológicos de bactérias multirresistentes na cidade de Pelotas e  
suscetibilidade à diidropirimidinona

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em  
Ciências, Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção,  
Universidade Federal de Pelotas.

**Banca Examinadora:**



Profa. Dra. Patrícia da Silva Nascente (Orientadora)  
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Biologia – UFPEL



Profa. Dra. Marlete Brum Gleff  
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Faculdade de Veterinária – UFPEL



Profa. Dra. Melissa Orzechowski Xavier  
Doutora em Ciências Pneumológicas pela Universidade Federal do Rio Grande do  
Sul -UFRGS  
Faculdade de Medicina – FURG

***Dedico este trabalho aos meus pais e irmãos.***

## Agradecimentos

A meus pais **Miguel (*in memoriam*)** e **Diná**, pelo exemplo, amor, educação e orientação em privilegiar sempre o caminho pessoal da retidão de caráter e do trabalho honesto e dedicado.

A minha **mãe** pelo amor incondicional que tenho recebido ao longo desses anos. Exemplo de carinho e dedicação incansável.

Aos meus irmãos **Antônio Carlos** e **Rosilene** pelo carinho, amor e imensa amizade. Exemplos de união e grande respeito. É um presente tê-los como irmãos nessa estrada da vida.

A todos os meus familiares, **sobrinhos, tios e primos**, que demostram sempre que família são alegria e união.

Ao meu querido **Hippolyto Ricardo**, pelo carinho, apoio, disponibilidade e orientações para a escrita do texto, essenciais na elaboração desta dissertação. Exemplo de dedicação, persistência e paciência.

Aos laboratórios de análise clínicas dos dois hospitais, por terem cedido as amostras, porque sem elas esse trabalho não seria possível, e principalmente pela amizade de todos os **colegas de trabalho**, pelo imenso carinho e apoio a minha trajetória nessa pesquisa.

A minha **orientadora Patrícia da Silva Nascente** que, por sua amizade e profunda compreensão, me deu todo o incentivo no caminho da pesquisa, apoio e estímulo para desenvolver este estudo. Um exemplo de seriedade, ética, trabalho incansável e dedicação à ciência. E, principalmente, por aceitar ter sido minha orientadora e pela tolerância demonstrada nesse período. Ao **Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção da UFPEL**, por permitir a realização dessa pesquisa.

E, principalmente, agradeço a **Deus** por me dar forças e persistência para chegar ao fim da realização desse sonho e, porque, sem Ele, não poderia estar aqui agradecendo a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

## Resumo

JARA, Marisa Castro. Estudos epidemiológicos de bactérias multirresistentes na cidade de Pelotas e suscetibilidade à diidropirimidinona. 2019. 94f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Bioprospecção) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS-2019.

A resistência bacteriana aos antibióticos constitui um problema de saúde pública em nível global. O uso indiscriminado de antibióticos tem acelerado esse processo, causando o aumento da morbimortalidade das infecções relacionadas à assistência à saúde. A ineficácia crescente dos antibióticos existentes proporcionou a necessidade do desenvolvimento de novas drogas antibacterianas, ocasionando o interesse dos pesquisadores nas propriedades medicinais dos compostos heterocíclicos nitrogenados, os “*compostos Bignelli*”, especialmente nas diidropirimidinonas. O objetivo deste trabalho foi analisar o perfil de suscetibilidade a antibióticos, de bactérias multirresistentes com dados dos pacientes, origem da amostra e sítio de infecção de dois hospitais de Pelotas, RS-Brasil, e testá-las *in vitro* frente a novos compostos de diidropirimidinonas de origem sintética. O estudo foi realizado entre outubro de 2018 a janeiro de 2019, com o cálculo amostral incluindo 286 isolados bacterianos multirresistentes a pelo menos três classes de antibióticos. Os isolados eram provenientes de coleta pulmonar, abdominal, superficial, sangue e urina de pacientes internados em unidade de tratamento intensivo adulto e neonatal, enfermarias, leitos particulares e convênios, além de ambulatoriais. Foram feitas análises estatísticas descritivas por meio do software estatístico SPSS versão 20.0. Os laudos foram emitidos pelos Laboratórios de Análises Clínicas de cada hospital estudado, em sistema automatizado VITEK® 2 (bioMérieux, França) e BD PHOENIX, de acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2012. A eficácia dos três compostos de diidropirimidinonas foi testada *in vitro* frente às bactérias multirresistentes de origem clínica hospitalar selecionada. Esses compostos foram sintetizados pelo laboratório de Lipidômica e Bio-orgânica da Universidade Federal de Pelotas, RS-Brasil. As análises foram realizadas por meio da Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima pelo método de microdiluição em caldo. A citotoxicidade dos compostos foi avaliada em fibroblastos de camundongo, linhagem celular 3T3. O perfil epidemiológico indicou maior resistência bacteriana em pacientes do sexo masculino, maiores de 70 anos, internados em enfermarias, predominantemente no trato urinário. *Klebsiella pneumoniae* foi a mais prevalente com 17,8%. Os bacilos Gram-negativo: *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* demonstraram resistência aumentada às penicilinas, às quinolonas e as cefalosporinas. Entre cocos Gram-positivo os mais resistentes foram *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase negativa* e *Staphylococcus haemolyticus*, frente aos macrolídeos, lincosaminas, e os glipopeptídeos. Os compostos sintéticos apresentaram atividade inibitória mínima em cocos Gram-positivos na concentração (0,16-80 µg/mL) com ação bactericida e nos bacilos Gram-negativos (23,2-80 µg/mL) com ação bacteriostática e não foram citotóxicos na maior concentração testada (80 µg/mL). A bactéria *E. faecium* apresentou a melhor CIM de 0,16 µg/mL enquanto a *Escherichia coli* foi a mais resistente em dois dos isolados testados. O estudo concluiu que as

infecções relacionadas à assistência à saúde constituem um grave problema de saúde pública no âmbito de sua realização. Apontando para a necessidade de novas pesquisas e o desenvolvimento de estratégias de prevenção e combate em nível local, confirmando tratar-se de uma epidemia em nível global. Indicando que os três compostos de diidropirimidinonas testados apresentaram atividade antibacteriana frente a bactérias multirresistentes, constituindo alternativas promissoras para o desenvolvimento de novos antibióticos.

**Palavras-chave:** bactérias multirresistentes; infecções hospitalares; antibióticos; epidemiologia; diidropirimidinonas.



## Abstract

JARA, Marisa Castro. Epidemiological studies of multiresistant bacteria in the city of Pelotas and susceptibility to dihydropyrimidinone. 2019. 94f. Dissertation (Master's Degree in Biochemistry and Bioprospecting) - Graduate Program in Biochemistry and Bioprospecting, Center for Chemical, Pharmaceutical and Food Sciences, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS- 2019.

Bacterial resistance to antibiotics is a global public health problem. The indiscriminate use of antibiotics has accelerated this process, causing increased morbidity and mortality of healthcare-related infections. The increasing inefficiency of existing antibiotics has led to the need for the development of new antibacterial drugs, causing researchers' interest in the medicinal properties of nitrogen-containing heterocyclic compounds, the "Bignelli compounds", especially dihydropyrimidinones. The objective of this study was to analyze the susceptibility profile of antibiotics, multiresistant bacteria with patient data, sample origin and infection site of two hospitals in Pelotas, RS-Brazil, and to test them in vitro against new compounds of dihydropyrimidinones of synthetic origin. The study was conducted between October 2018 and January 2019, with the sample calculation including 286 multiresistant bacterial isolates from at least three classes of antibiotics. The isolates were collected from the pulmonary, abdominal, superficial, blood and urine samples of patients hospitalized in an intensive care unit for adult and neonatal care, infirmaries, private beds and covenants, as well as outpatient clinics. Statistical analyzes were performed using SPSS software version 20.0. The reports were issued by the Clinical Analysis Laboratories of each hospital studied, in automated system VITEK® 2 (bio-Mérieux, France) and BD PHOENIX, according to the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012. The efficacy of the three dihydropyrimidinone compounds was tested in vitro against the multiresistant bacteria of selected hospital clinical origin. These compounds were synthesized by the Laboratory of Lipidomics and Bio-organic of the Federal University of Pelotas, RS-Brazil. The analyzes were carried out by means of the Minimal Inhibitory Concentration and Minimum Bactericidal Concentration by the broth microdilution method. The cytotoxicity of the compounds was evaluated in mouse fibroblasts, a 3T3 cell line. The epidemiological profile indicated greater bacterial resistance in male patients, older than 70 years, hospitalized in infirmaries, predominantly in the urinary tract. *Klebsiella pneumoniae* was the most prevalent with 17.8%. Gram-negative bacilli: *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, showing increased resistance to penicillins, quinolones and cephalosporins. Among Gram-positive cocci, the most resistant were *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase negative* and *Staphylococcus haemolyticus*, compared to macrolides, lincosamines, and glycopeptides. The synthetic compounds showed minimal inhibitory activity in Gram-positive cocci in concentration (0.16-80 µg/mL) with bactericidal action and Gram-negative bacilli (23.2-80 µg/mL) with bacteriostatic action and were not cytotoxic at the highest concentration tested (80 µg/mL). *E. faecium* had the best MIC of 0.16 µg / mL while *Escherichia coli* was the most resistant in two of the isolates tested. The study concluded that health-care-related infections are a serious public health problem in the context of their implementation. Pointing out the need for new research and the development of prevention and fighting strategies at the local level, confirming that

this is an epidemic at the global level. Indicating that the three dihydropyrimidinone compounds tested showed good antibacterial activity against multiresistant bacteria, constituting promising alternatives for the development of new antibiotics.

**Keywords:** multiresistant bacteria; hospital infections; antibiotics; epidemiology; dihydropyrimidinones.

## Lista de Figuras

|                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 – Estrutura geral de uma Diidropirimidina (DHP). ....          | 27 |
| Figura 2 – Síntese das diidropirimidinonas.....                         | 28 |
| Figura 3 – Estruturas de Pirimidina com tiamina, citosina e uracil..... | 28 |

## Manuscrito 2

|                                                                                            |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 1. Biginelli reaction and formation of the compounds of interest. ....              | 58 |
| Figure 2. Cytotoxicity of dihydropyrimidinone analogs (4a, 4b and 4c) using MTT assay..... | 63 |

## **Lista de Tabelas**

### **Manuscrito 1**

|                                                                                                                                                                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Table 1. Epidemiological profile of patients with regard to multi-resistant bacteria in two hospitals in Pelotas RS Brazil, 2018-2019 .....                                                                         | 53 |
| Table 2. Rates of resistance and sensitivity of multi-resistant bacteria to antibiotic classes tested for Gram-negative bacilli and Gram-positive cocci found in two hospitals in Pelotas RS Brazil, 2018-2019..... | 54 |
| Table 3. Distribution of the epidemiological profile of the classes of antibiotics that presented the greatest bacterial resistance from two hospitals in the city of Pelotas RS BR, 2018-2019 .....                | 55 |

### **Manuscrito 2**

|                                                                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Table 1. Mean of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of DHP's against multiresistant bacteria of hospital origin..... | 61 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

## SUMÁRIO

|                                                                                                                |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 Introdução.....</b>                                                                                       | <b>12</b> |
| <b>2 Objetivos.....</b>                                                                                        | <b>14</b> |
| Objetivo geral .....                                                                                           | 14        |
| Objetivos específicos.....                                                                                     | 14        |
| <b>3 Revisão de Literatura.....</b>                                                                            | <b>15</b> |
| Infecção Relacionada à Assistência à Saúde (IRAS) .....                                                        | 15        |
| Resistência bacteriana.....                                                                                    | 17        |
| Mecanismos de resistência.....                                                                                 | 19        |
| Bactérias multirresistente: ESKAPE e ESKAPEEc.....                                                             | 21        |
| Diidropirimidinas (DHP's)e Diidropirimidinonas (DHPM's) .....                                                  | 26        |
| Propriedades gerais das DHP's e DHPM's .....                                                                   | 26        |
| Atividade antimicrobiana do anel diidropirimidina (DHP).....                                                   | 29        |
| <b>4 Manuscritos .....</b>                                                                                     | <b>31</b> |
| Manuscrito 1 - Multidrug-resistant hospital bacteria: Epidemiological factors and susceptibility profile ..... | 31        |
| Manuscrito 2 – 3,4 dihydropyrimidin-2-(1h)-ones analogues against multiresistant bacterial .....               | 56        |
| <b>5 Conclusão .....</b>                                                                                       | <b>66</b> |
| <b>Referências .....</b>                                                                                       | <b>68</b> |
| <b>Anexos .....</b>                                                                                            | <b>76</b> |
| Anexo A – Carta de Anuência – HE UFPel .....                                                                   | 77        |
| Anexo B – Carta de Anuência – Santa Casa de Misericórdia de Pelotas .....                                      | 78        |
| Anexo C – Parecer do Consubstanciado do Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) .....                                 | 79        |
| Anexo D – Parecer do Consubstanciado Nacional do Comitê de Ética e Pesquisa (CONEP) .....                      | 83        |
| Anexo E – Comprovante de submissão do artigo .....                                                             | 93        |

## 1 Introdução

A multirresistência bacteriana (BMR) crescente aos antibióticos (ATB) constitui um problema de saúde pública em nível global (TEGOS; HAMBLIN, 2015; ESPOSITO; DE SIMONE, 2017; LORENZONI *et al.*, 2018). Diversas organizações nacionais e internacionais como a Organização Mundial de Saúde (OMS) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), têm promovido pesquisas, divulgado relatórios e proposto estratégias de combate às infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) (WHO, 2011; ANVISA, 2017a).

É importante ressaltar que a resistência bacteriana constitui um processo de mutações e recombinações genéticas naturais, independentes da intervenção humana (MUKERJI *et al.*, 2017; LORENZONI *et al.*, 2018). Entretanto, fatores humanos como o uso indiscriminado de ATB, algumas vezes sem prescrição médica, a interrupção precoce de tratamentos, prescrições médicas inadequadas e prolongamento desnecessário dos tratamentos, têm representado causas decisivas para o aumento acelerado e artificial do problema em escala mundial, gerando uma verdadeira epidemia relativamente fora de controle (ROSSI *et al.*, 2017; ARGUDIN *et al.*, 2017; MACINTYRE; BUI, 2017).

Essas circunstâncias tem causado um aumento crescente nos gastos públicos com o sistema de saúde, aumento da mortalidade e da morbidade, e sobrecarga nos serviços de saúde em razão da necessidade do prolongamento nas internações (ANVISA, 2004a; SOUZA *et al.*, 2015; SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016; ESPOSITO; DE SIMONE, 2017).

Os ATB mais frequentemente prescritos se tornaram ineficazes, gerando a necessidade de maiores investimentos financeiros públicos e privados no desenvolvimento de novos medicamentos mais eficazes (BRINKAC *et al.*, 2017).

A comunidade científica se empenha na pesquisa de novos ATBs e novas abordagens terapêuticas para o combate dessa epidemia mundial (BRINKAC *et al.*, 2017). A necessidade do desenvolvimento de novos ATB, que se mostrem mais eficazes no combate às bactérias multirresistentes, tem gerado crescente interesse dos pesquisadores nas propriedades medicinais dos compostos heterocíclicos nitrogenados conhecidos como “*compostos Bignelli*”, especialmente nas diidropirimidinonas (DHPM's) e seus derivados, os quais são obtidos na natureza ou sinteticamente (GODOI *et al.*, 2005; MANSOURI *et al.*, 2012). As DHPMs passaram

a ser amplamente pesquisadas a partir da década de 1990, em razão de suas amplas propriedades terapêuticas (KAPPE, 2000; FATHIMA *et al.*, 2013; RAMACHANDRAN *et al.*, 2016; NIEMIROWICZ-LASKOWSKA *et al.*, 2018; VENUGOPALA *et al.*, 2016).

Um dos problemas encontrados para o planejamento das estratégias sanitárias mais eficazes reside na ausência de um consenso, na comunidade científica, acerca da real dimensão da resistência bacteriana, diferentes autores têm apresentado estimativas diversas sobre a situação dessa epidemia no mundo (O'NEILL, 2014; DE KRAKER, 2016).

Nesse contexto, a pesquisa proposta pretende contribuir com informações epidemiológicas localizadas e atualizadas sobre a efetiva dimensão das IRAS no sul do RS. Partindo do pressuposto de que informações precisas sobre o problema em nível local são essências para traçar um panorama global sobre o assunto. Visando, ainda, testar especificamente à eficácia de novos compostos sintéticos de DHPM's frente a bactérias multirresistentes de origem clínica hospitalar.

## 2 Objetivos

### Objetivo geral

Analisar o perfil epidemiológico e de suscetibilidade à antibióticos (ATB) de bactérias multirresistentes (BMR), oriundas de dois hospitais de Pelotas – RS e testá-las *in vitro* frente a novos compostos de diidropirimidinonas (DHPM's) de origem sintética.

### Objetivos específicos

- Identificar o perfil epidemiológico geral e específico das infecções por BMR em relação ao sexo e faixa etária dos pacientes, local de internação e isolamento bacteriano.
- Identificar as bactérias multirresistentes mais prevalentes nos dois hospitais estudados.
- Identificar os isolados bacterianos mais resistentes às classes de ATB e relacioná-los frente ao perfil do paciente no âmbito do estudo.
- Verificar a eficácia antimicrobiana *in vitro* de três análogos de DHPM's sintéticos frente às BMRs de origem clínica hospitalar.



### 3 Revisão de Literatura

#### **Infecção Relacionada à Assistência à Saúde (IRAS)**

O Ministério da Saúde (através da Portaria n.º 930 de 27 de agosto de 1992, Anexo II (BRASIL, 1992) definiu infecção hospitalar (IH) como “qualquer infecção adquirida após a internação do paciente e, que se manifesta durante a internação ou mesmo após a alta, quando puder ser relacionada com a internação ou procedimentos hospitalares”. Porém, na década de 1990, foi substituído o termo IH por IRAS, integrando com esta nova conceituação todas as infecções adquiridas e que estejam associadas à assistência em todos os ambientes (PADOVEZE; FORTALEZA, 2014).

No Brasil, as diretrizes para as medidas de prevenção e controle de IRAS estão determinadas na Lei 9.431/1997 (BRASIL, 1997), na Portaria 2.616/1998 (BRASIL, 1998) e na RDC 48/2000 (ANVISA, 2000), sendo um importante marco para a obrigatoriedade da composição das Comissões de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) nos hospitais.

O estudo de Prade *et al.* (1995), realizado a pedido da Anvisa (2013), constitui o único levantamento em nível nacional sobre IRAS no Brasil. Essa pesquisa identificou as infecções prevalentes em 99 hospitais terciários (alta complexidade), encontrando o índice de 15% de IRAS. Devido ao longo tempo transcorrido após sua realização, existe uma desconfiança razoável de que este percentual esteja defasado. Outro problema, que tem impedido a atualização desses dados reside na dificuldade da coleta dos registros hospitalares acerca dessas infecções, de modo, que não se encontra disponível um relatório atual e preciso (SOUZA *et al.*, 2015).

O Plano Nacional para a Prevenção e o Controle da Resistência Microbiana nos Serviços de Saúde da Anvisa, reunindo os dados nacionais disponíveis, produziu os Boletins Informativos de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde, elaborados pela Gerência de Vigilância e Monitoramento em Serviços de Saúde (GVIMS) e colaboradores. O primeiro relatório da Rede Nacional de Monitoramento de Resistência, publicado em 2013, pesquisou 908 hospitais de 26 estados da federação, englobando 19.009 micro-organismos responsáveis por causarem infecções primárias de corrente sanguínea (IPCS) em Unidades de

Tratamento Intensivo (UTI's) brasileiras, e confirmou que a resistência microbiana constitui um problema de saúde pública em nível nacional.

O Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 14, divulgado em dezembro de 2016, informou que, num universo de 22.499 notificações de identificações de IPCS em UTI adulto em 2015, as bactérias mais frequentes encontradas foram as seguintes: *Klebsiella pneumoniae* (16,9% n=3.805), seguido de *Staphylococcus* Coagulase Negativo (SCoN) (16,5% n=3.703), *Staphylococcus aureus* (13,2% n = 2.734), *Acinetobacter* spp. (12,2% n=2.734) e *Pseudomonas aeruginosa* (10,0% n=2.242). Sendo que foi identificado que esses índices variam conforme a região do país.

Segundo a OMS (WHO, 2011), a resistência bacteriana decorrente de IRAS representa um problema crescente de saúde pública em nível mundial. De acordo com Allegranzi *et al.* (2011), a incidência de IRAS é consideravelmente superior nos países de baixa e média renda, apresentando uma média de 15,5% em comparação com 7,1% na Europa e 4,5% nos EUA. Magill *et al.* (2014) e Erdem *et al.* (2014) ressaltam que as IRAS representam um problema mais grave nas UTI's. A OMS (WHO, 2011) confirma que as IRAS são prevalentes em UTI's, estimando um índice de 9,1% nos EUA, 23,0% na Europa e 23,5% na Inglaterra enquanto nos países de baixa e média renda esse percentual sofre um aumento significativo apresentando um índice de 35,2%. Conforme Ribeiro e Cortina (2016), as IRAS contraídas por pacientes internados em UTI é a quarta causa estimada de mortalidade no Brasil.

Conforme a Anvisa (2010), as infecções do trato urinário (ITU) no Brasil correspondem a 30% a 50% das infecções nosocomiais. Anghinoni *et al.* (2018), referem os dados encontrados na pesquisa de Warren (1997) que apontam que as ITUs decorrentes da utilização de cateter urinário de demora constituem a segunda causa recorrente mais importante de morbimortalidade em hospitais na América do Norte.

As internações em UTI's representam um aumento de 5 a 10 vezes a possibilidade de adquirirem alguma IRAS retratando 20% aproximadamente o índice de IRAS no hospital; estas estão intimamente relacionadas em proporcionalidade com a gravidade da doença, condições nutricionais do paciente, o prolongamento na internação, além do local de internação, a natureza dos procedimentos invasivos diagnósticos e terapêuticos, tempo de internação, terapia adequada, entre outros (ANDRADE *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2015; ESPOSITO; DE SIMONE, 2017).

Segundo pesquisa de Khan *et al.* (2017), as causas de IRAS mais frequentes são: infecções por sutura, aplicação de medicamentos percutâneos ou subcutâneos, manuseio de agulhas, contato com material biológico do paciente, contato do profissional com o paciente e vice-versa, ventilação mecânica, entre outros.

Os agentes patogênicos causadores das IRAS dentro do ambiente hospitalar são provenientes de fonte endógena do paciente, como a boca, nariz, o trato gastrointestinal, órgãos sexuais, a pele; e de fonte exógena, ambiente hospitalar, que ocorrem pela transmissão de patógenos por meio da inter-relação dos profissionais de saúde com o paciente, equipamentos e superfícies inanimadas (RIBEIRO; CORTINA, 2016).

Entre os agentes causadores das infecções nosocomiais estão bactérias, vírus e fungos. Segundo Khan *et al.* (2017), as bactérias representam 80% das IRAS e as cepas mais recorrentes são: *Acinetobacter ssp.*, *Clostridium difficile*, *Klebsiella ssp.* e *Escherichia coli*. Entre os vírus estão os da Hepatite B e C, vírus influenza, HIV, rotavírus e vírus do herpes simples. Quanto aos fungos destacam-se *Aspergillus spp.* e *Candida albicans*.

Consequentemente, as IRAS causadas pelas BMR destacam-se pelo elevado índice de morbimortalidade, altos custos hospitalares, além dos danos pessoais, profissionais e emocionais (ANVISA, 2004b; OLIVEIRA; DE PAULA, 2012).

## **Resistência bacteriana**

O problema do aumento em nível global da resistência bacteriana a múltiplos ATB tem preocupado os órgãos de vigilância em saúde no mundo. Nesse sentido, a OMS (WHO, 2018) tem proposto estratégias de ação para combater essa epidemia em nível nacional e internacional, elaborando boletins de acompanhamento da evolução epidemiológica do problema.

Não existe consenso na comunidade científica acerca da definição do termo “multirresistência bacteriana”. Magiorakos *et al.* (2012) propõem a seguinte terminologia: Bactérias Multirresistentes à Antibióticos (MDR) foi definida como não susceptibilidade adquirida a pelo menos um agente em três ou mais categorias antimicrobianas, Bactérias Extensivamente Resistentes à Antibióticos (XDR) foi definida como não suscetibilidade a pelo menos um agente em todas as categorias, exceto duas ou menos antimicrobianas (ou seja, isolados bacterianos permanecem

suscetíveis a apenas uma ou duas categorias) e a Bactérias Plenamente Resistentes à Antibióticos (PDR) foi definida como não suscetibilidade a todos os agentes em todas as categorias antimicrobianas. Essa variação na nomenclatura tem gerado confusões na divulgação de informações mais claras e acessíveis ao público em geral e aos formuladores de políticas de saúde pública. A utilização da terminologia internacional padronizada significaria um avanço importante para melhorar a comparação dos dados de vigilância e para a formulação de políticas epidemiológicas nos níveis global, regional e local (MAGIORAKOS *et al.*, 2012).

Embora a resistência bacteriana ocorra através de mecanismos naturais, o uso excessivo e sem indicação médica adequada de antimicrobianos, além de medidas de prevenção e de controle ineficazes tem acelerado esse processo (SAMPAIO *et al.*, 2013; WHO, 2018). O aumento da resistência antimicrobiana ocorre geralmente em razão de mutações genéticas (aquisição de genes ou mutações espontâneas) nas superbactérias que tornam ineficazes a ação terapêutica dos ATB's disponíveis (BROGAN; MOSSIALOS, 2013; BASSETTI; RIGHI, 2015; SANTAJOIT; INDRAWATTANA, 2016).

Outro fator que influencia de forma relevante a resistência bacteriana, é a disseminação clonal de isolados bacterianos multirresistentes e por processos de recombinação, como a conjugação. A política racional de ATB's pode influenciar na redução da pressão de seleção de antibióticos. Por outro lado, políticas públicas epidemiológicas e de higiene podem, por sua vez, reduzir a disseminação clonal de bactérias resistentes. A transferência de elementos móveis entre células bacterianas, entretanto, não pode ser combatida através de práticas clínicas (MAGIORAKOS *et al.*, 2012; SEDLÁKOVÁ *et al.*, 2014).

Outra forma de aumento da resistência aos ATB consiste na formação de biofilmes, ou seja, na formação de uma colônia de micro-organismos envolta e associada a uma matriz protetora de biopolímero autoproduzida, constituída por DNA extracelular, exopolissacarídeos, vesículas lipídicas e proteínas da matriz que se adere a qualquer superfície e ambiente. Esses biofilmes desempenham uma função de proteção microbiana a agentes externos, como a antibioticoterapia (STEENACKERS *et al.*, 2016).

O problema da resistência bacteriana (BROGAN; MOSSIALOS, 2013; CAG *et al.*, 2016) ameaça a eficácia das medidas de prevenção e dos tratamentos das doenças infecciosas mais comuns, resultando em doenças com internações mais

prolongadas e altos índices de mortalidade, o que tem aumentado os custos com os cuidados de saúde, e exigindo mais atenção intensiva (ANVISA, 2004b; SOUZA *et al.*, 2015; ESPOSITO; DE SIMONE, 2017).

Segundo ANVISA (2016), o perfil dos microrganismos em relação a fenotipagem, encontrada em UTI's adulto, foi observado nos cocos Gram-positivo (CGP) uma taxa de resistência do SCoN de 74,9% à oxacilina, enquanto os *S. aureus* apresentaram um índice de 57,4% de, e os *Enterococcus* spp. de 28,8% de resistência à vancomicina. Nos bacilos Gram-negativo (BGN) não fermentadores, a resistência aos carbapenêmicos foi reportada em 77,4% dos *Acinetobacter* spp. e 39,1% de *P. aeruginosa*. Entre os *Enterobacteriaceae*, as taxas de resistência aos carbapenêmicos e às cefalosporinas, de terceira e quarta geração, foram de 9,7% para *E. coli*, 43,3% para *K. Pneumoniae* e 21,6% para *Enterobacter* spp.

## **Mecanismos de resistência**

A resistência bacteriana é a capacidade dos microrganismos resistirem à concentração do fármaco no sangue e pode ocorrer por via natural ou intrínseca e, adquirida. A resistência bacteriana ocorre quando o fármaco com ação antimicrobiana perde a ação bactericida (matar) ou bacteriostática (inibir) frente às cepas bacterianas (RIBEIRO; CORTINA, 2016).

Resistência natural ou intrínseca corresponde a uma característica genética hereditária da espécie bacteriana que é transmitida verticalmente a sua prole. A resistência intrínseca está relacionada com várias características dos microrganismos, dentre as quais está a presença ou ausência do alvo na célula bacteriana para ação do antibiótico em questão a impermeabilidade da parede celular e o aumento da extrusão do antimicrobiano através do mecanismo de efluxo (VERDI *et al.*, 2016).

A resistência adquirida é considerada o tipo mais importante de resistência, ocorre pela seleção dos microrganismos mais resistentes ao antimicrobiano que antes eram sensíveis. Isso acontece pela mudança na composição genética que se originam de alteração do cromossomo (mutação) ou aquisição de genes de resistência (por plasmídeos ou transposons) de outras bactérias. O fenômeno de mutação espontânea ou cromossômica é o resultado de um erro na replicação do DNA (deleção, substituição ou adição de um ou mais pares de bases), ocorrendo

alterações na composição de aminoácidos de determinados peptídeos (RIBEIRO; CORTINA, 2016; VERDI *et al.*, 2016).

Os genes de resistência são decorrentes de aquisição de material genético. A transferência genética ocorre por quatro mecanismos de transformação, transdução, conjugação e transposição (RIBEIRO; CORTINA, 2016; SHAIKH *et al.*, 2015).

As bactérias adquirem resistência a múltiplas drogas principalmente por três principais mecanismos como a redução de absorção do fármaco, a modificação do alvo e pela inativação do medicamento (TEGOS; HAMBLIN, 2015; CAG *et al.*, 2016).

O mecanismo de inativação enzimática é considerado o mais importante na resistência bacteriana que impede a ação do fármaco pela produção de enzimas capazes de inativar, bloquear ou modificar estruturalmente a droga. Os BGN produzem enzimas de modo a tornar a estrutura do antibiótico irreversível, como as  $\beta$ -lactamases que destroem por hidrólise o anel  $\beta$ -lactâmico, pela enzima  $\beta$ -lactamase produzida pela bactéria. Outra enzima é a  $\beta$ -lactamase de Espectro Estendido (ESBL), medeia à resistência a todas cefalosporinas e penicilinas e as metalo-lactamases (MBL), que hidrolisam os fármacos  $\beta$ -lactâmicos; exceto o azetreonam, um monolactâmico (OLIVARES *et al.*, 2013; RIBEIRO; CORTINA, 2016; VERDI *et al.*, 2016).

A permeabilidade da membrana do microrganismo é imprescindível para que a droga tenha efeito bactericida ou bacteriostático. Um dos mecanismos de resistência das bactérias gram-negativa é a redução de porinas, que são proteínas (lipídeos e peptideoglicanos), situadas na membrana externa com função de internalizar nutrientes hidrofílicos. Com essa estratégia os microrganismos se defendem pela menor quantidade de droga internalizada (SHAIKH *et al.*, 2015).

A alteração do sítio de ação do antibiótico ocorre pela mutação do gene que alteram os sítios-alvo das drogas, modificando a estrutura celular, como a troca de um aminoácido nas Proteínas Ligadoras de Penicilina (PBP's) diminuindo a susceptibilidade à droga.

O Sistema de Efluxo para Multidrogas (MES) aumenta a retirada de antibióticos do compartimento intracelular (bomba de efluxo) por um espaço intermembranar em bactérias gram-negativas. As bombas expulsam constantemente o antibiótico do interior da célula microbiana diminuindo a concentração das drogas e resultando na insuficiência de concentração adequada para a ação antibiótica e contribuindo para a multirresistência (TEGOS; HAMBLIN, 2015).

## Bactérias multirresistente: ESKAPE e ESKAPEEc

A designação ESKAPE, proposta por Rice (2008), reúne as letras iniciais dos nomes de um grupo de bactérias que incluem *E. faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* e *Enterobacter* spp. Angelis *et al.* (2018), por sua vez, propuseram o termo ESKAPEEc, que inclui os patógenos ESKAPE acrescentando as letras iniciais da bactéria *E. coli*, afirmando que esse grupo de bactérias representa os principais patógenos que adquirem multirresistência hospitalar, sendo conhecidos por sua alta virulência e elevada capacidade para desenvolver e disseminar a resistência antimicrobiana, aumentando mundialmente o risco de IRAS na corrente sanguínea. Afirmção semelhante é encontrada no estudo de Brogan e Mossialos (2013), Bassetti e Righi (2015) e Santajit e Indrawattana (2016).

*Enterococcus* spp. são CGP, encontrados em pares ou em cadeias, anaeróbios facultativos, habitam a microbiota normal do trato genital feminino e trato gastrointestinal. O gênero de *Enterococcus* spp. compreende 54 espécies descritas, sendo que as espécies *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* possuem maior relevância clínica pelo alto número de IRAS (TERRA *et al.*, 2018).

*E. faecalis* continua sendo a bactéria mais prevalente, nos últimos 20 anos, porém, a *E. faecium* passou a atrair a atenção da comunidade científica em nível global por sua crescente resistência a múltiplos antibióticos, especialmente a ampicilina e as quinolonas. Isso se deve a propagação de um complexo clonal 17 (CC-17), caracterizado pela suposta presença de ilhas de patogenicidade e pela resistência à ampicilina e quinolonas que estão relacionados com surtos hospitalares em todos os continentes, porém esse complexo não é comumente encontrado no Brasil (CONCEIÇÃO *et al.*, 2011). Entre essas duas espécies o *E. faecalis* causa a maioria das infecções alimentares por sua presença na maioria das proteínas de origem animal, porém, o *E. faecium* é o maior responsável pela multirresistência adquirida em hospitais (SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016).

A expressão de genes de resistência em *Enterococcus* spp. levam à síntese alterada de aminoácidos terminais precursores de peptidoglicano (componente principal da parede celular), produzindo outros precursores de D-Ala- D-Ala a D-Ala- D-lactato (D-Ala- D-Lac) ou D-Ala- D-serina (D-Ala- D-Ser), bloqueando a incorporação e resultando em menor afinidade pela vancomicina (WERNER, 2012).

Enterococos apresentam seis genótipos e fenótipos, sendo três de maior frequência, tendo adquirido resistência à vancomicina, teicoplanina, penicilinas e aminoglicosídeos. Dentre os genes, o VanA e o VanB são os mais encontrados na resistência induzível à vancomicina, enquanto o gene VanC confere baixo nível de resistência intransferível à vancomicina. A *E. faecium*, possui índices superiores a 95% de resistência à vancomicina (VRE) nos Estados Unidos, apresentado também alta resistência a ampicilina em nível mundial. Em contrapartida, estudo molecular brasileiro demonstrou que esse VRE não é comum em nosso país (CONCEIÇÃO *et al.*, 2011).

*S. aureus* são cocos Gram-positivos, catalase e coagulase positivos, 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, imóveis, anaeróbios facultativos, não esporulados, apresentam-se com diferentes arranjos: isolados, aos pares, em cadeias curtas ou agrupados com característica de cacho de uva, possuem cápsula de polissacarídeos com membrana constituída de um complexo de proteínas, lipídeos e carboidratos. *S. aureus* é considerado o mais patogênico do gênero *Staphylococcus*, pela fácil transmissão entre as pessoas, objetos e o ambiente (KHAN *et al.*, 2015; LIMA *et al.*, 2015).

*S. aureus* hospeda a pele, narinas, garganta, intestino de humanos e animais, sendo de fácil transmissão pelas vias aéreas, contato físico; sendo as mãos a maior fonte de infecção em ambiente hospitalar, podendo ocasionar endocardites, osteomelites, pneumonias, septicemias fatais e meningite, com altas taxas de morbidade e mortalidade (SAMPAIO *et al.*, 2013).

*S. aureus*, tornou-se uma das bactérias mais resistentes aos tratamentos antibióticos mundialmente, sendo uma causa generalizada de infecções graves nos serviços de saúde e na comunidade. A OMS (WHO, 2018) estima que as pessoas infectadas por *S. aureus* resistente à *meticilina* (MRSA) tenham probabilidade 64% maior de morrer do que as pessoas com uma forma não resistente do micro-organismo. *S. aureus* adquire resistência por meio da aquisição de genes por mutação de bactérias da mesma espécie ou eventualmente pela aquisição de genes de outras espécies até mesmo por mutações em seus próprios genes (SAMPAIO *et al.*, 2013).

O *S. aureus* confere resistência a penicilina através da síntese da enzima  $\beta$ -lactamase que inativa o composto antimicrobiano, designado *S. aureus* resistente à oxacilina (ORSA) e a resistência à *meticilina* que está associada a um gene *mecA*,



que codifica uma proteína se ligando à penicilina com baixa afinidade pelo antibiótico e designado por MRSA (SAMPAIO *et al.*, 2013).

*S. aureus* resistentes à vancomicina (VRSA) apresentam resistência completa a esse glicopeptídeo, através da aquisição por conjugação do *S. aureus* de um plasmídeo ou transposon carreador do gene *VanA* oriundo do *E. faecalis*, resistente aos glicopeptídeos. Além do VRSA, há outro fenótipo, *S. aureus* intermediário à vancomicina (VISA), que está relacionado com o espessamento da parede bacteriana, impossibilitando a ação do glicopeptídeo devido à captura de suas moléculas que ficam retidas na parede bacteriana e comprometem a eficácia terapêutica deste agente (SAMPAIO *et al.*, 2013).

A resistência do *S. aureus* com fenótipos VRSA, VISA e resistência intermediária heterogênea à vancomicina (hVISA), ainda é rara ao ATB vancomicina. Esta bactéria desafia a medicina moderna, uma vez que os glicopeptídeos apresentam-se como uma das últimas opções disponíveis para o tratamento de infecções graves causadas por MRSA (SAMPAIO *et al.*, 2013).

*K. pneumoniae*, BGN, pertence à família de Enterobacteriaceae, encontrada na natureza, animais e humanos. Nestes últimos, está presente principalmente na microbiota intestinal, nariz e boca. Existem diversas espécies de *Klebsiella* spp., tais como: *K. pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella granulomatis*, *Klebsiella terrigena* e *Klebsiella planticola*. Esse patógeno é frequente nas IRAS e comunitárias, sendo *K. oxytoca* e *K. pneumoniae*, as espécies mais encontradas em pacientes com pneumonia (YAYAN *et al.*, 2015), e na septicemia neonatal, infecções de feridas e septicemias (KHAN *et al.*, 2017).

Isolados de *K. pneumoniae* adquiriram uma grande variedade de enzimas  $\beta$ -lactamases, inativando a estrutura química dos ATBs  $\beta$ -lactâmicos, tais como penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos (CAG *et al.*, 2016). Em 1983 as espécies de *Klebsiella* spp. foram identificadas como produtoras de ESBL, com um crescente aumento de multirresistência mundialmente (RUIZ *et al.*, 2019).

Os ATBs carbapenêmicos são utilizados no tratamento de infecções persistentes causadas por bactérias Gram-negativas, no entanto a prevalência crescente de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenemase (KPC), que ocorre com a resistência codificada pelo bla<sub>KPC</sub> e por estar localizada em um plasmídeo, a enzima carbapenemase possui alto grau de disseminação pela transferência e acúmulo de genes de resistência podendo representar uma ameaça a outros ATB's,

tais como  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas (SEIBERT *et al.*, 2014). A enzima KPC mais prevalente nas *Klebsiellas* é do tipo carbapenemase Classe A (CAG *et al.*, 2016). Conforme a OMS (WHO, 2011), a *K. pneumoniae* apresenta alta resistência aos carbapenêmicos, tornando-os ineficazes no tratamento de mais da metade das pessoas infectadas por essa bactéria.

A resistência da *K. pneumoniae* é uma das mais preocupantes, tendo se difundido rapidamente em escala mundial, sendo uma das principais causas de IRAS, como pneumonia, infecções da corrente sanguínea e infecções em recém-nascidos e pacientes de UTI (WHO, 2018). Segundo Ruiz *et al.* (2019), atualmente mais de 30% das IRAS ocorrem por *K. pneumoniae multirresistente* principalmente em pacientes imunodeprimidos, no prolongamento de internação, trazendo altos custos hospitalares, e aumentando a morbimortalidade, acentuando-se pelas limitações terapêuticas disponíveis.

*A. baumannii* é um cocobacilo Gram-negativo não fermentador que habita água e solo (TENG *et al.*, 2015) preferencialmente climas úmidos. A presença desse patógeno oportunista no trato gastrointestinal pode aumentar a gravidade de infecções resistentes, emergindo nos últimos dez anos como uma das causas mais preocupantes de IRAS, pela dificuldade de sua eliminação do ambiente hospitalar por sua resistência à desinfecção e por resistir a dessecação por formarem biofilmes que protegem o micro-organismo e os tornam mais resistentes. Várias linhagens desse patógeno apresentam resistência sérica e produzem sideróforos, sendo capazes de sequestrar o ferro das proteínas do hospedeiro, possibilitando assim sua sobrevivência (HORNSEY; WAREHAM, 2018).

A diabetes mellitus, doença pulmonar, tabagismo e alcóolatrás são uns dos fatores de risco predispostos na infecção por *A. baumannii*. Nos pacientes internados, infecções como a pneumonia associada à ventilação mecânica (PAVM), sepse por associação ao cateter, infecções de ferida e tecidos moles, trato urinário, endocardite pós-cirúrgica e meningite (ELHOSSEINY; ATTIA, 2018).

*A. baumannii* são bactérias de importância clínica por serem frequentemente resistentes aos antibióticos devido aos seguintes mecanismos de ação: bombas de efluxo, baixa permeabilidade, abrigo de genes de resistência em ilhas genéticas e alta plasticidade genética (ELHOSSEINY; ATTIA, 2018). Têm sido relatado o surgimento de isolados produtoras de carbapenemase, metalo- $\beta$ -lactamases, codificada por *bla<sub>IMP</sub>*, e oxacillinase serina *p*-lactamases, codificados por *bla<sub>OXA</sub>*

que têm adquirido resistência tanto a colistina e ao imipenem; quando há combinação de genes de resistência, torna capazes de evadir a ação da maioria dos compostos antibióticos tradicionais (CAG *et al.*, 2016).

Rodloff e Dowzicky (2017) relataram em relatório recente European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net), o complexo *A. baumannii-calcoaceticus* foram resistentes em 37% imipenem e meropenem, drogas de escolha para o tratamento de pneumonia associada à ventilação mecânica (PAVM), neste contexto apesar das polimixinas continuarem eficazes aos isolados de *Acinetobacter*, esse ATB continua sendo considerado como última escolha de tratamento por ser nefrotóxico e neurotóxico.

*P. aeruginosa* é um bacilo Gram-negativo, aeróbio facultativo, tolerante a variações de temperatura e oportunista. É encontrado no ambiente, na água, no solo, em plantas, animais e pessoas, colonizam regiões úmidas do hospedeiro como: axilas, mucosa nasal e orofaríngea. Esse patógeno causa infecções em diversas regiões do corpo, especialmente em pacientes imunocomprometidos e com fatores de risco, com utilização de ventilação mecânica e cateteres (KHAN *et al.*, 2015; SAMPAIO *et al.*, 2013).

As IRAS por *P. aeruginosa* são consideradas as principais causas com risco de morte no mundo inteiro (ESPOSITO; DE SIMONE, 2017). Em ambiente hospitalar se manifestam principalmente no trato respiratório, no trato urinário, infecção de pele e tecidos moles, bacteremias, queimaduras, endocardite entre outros (PELEG; HOOPER, 2010; DEUTSCH *et al.*, 2016).

Na fibrose cística (FC), a *P. aeruginosa* é comumente associada por sobreviver em condições microaeróbicas, como no muco espesso desses pacientes com FC (PENDLETON *et al.*, 2013). A *P. aeruginosa* é associada a surtos em todo o mundo pela disseminação de clones de vários tipos de sequência, sendo os clones ST235, ST111 e ST175 os mais difundidos; entre estes, o ST235, considerado o mais prevalente e referenciado como: “internacional”, de “alto risco” ou “generalizado” por apresentar desfechos fatais (OLIVER *et al.*, 2015; TREEPONG *et al.*, 2018).

Segundo Peleg e Hooper (2010), a PAVM adquirida por mais de 48h de internação, ocorre em cerca de 10 a 20% dos pacientes colonizados especialmente por *P. aeruginosa*. Um grande fator de risco em enfermos queimados é a colonização por *P. aeruginosa* na prática da balneoterapia (hidroterapia em

pacientes com lesão térmica) ainda usada em alguns centros de queimados no Brasil e abandonada na maior parte do mundo. Como esses pacientes perdem a integridade da pele, o tecido necrótico e os micro-organismos removidos durante o banho podem contaminar outros pacientes pelos biofilmes formados dessa bactéria retidos na banheira (DEUTSCH *et al.*, 2016).

A resistência aos ATB's por *P. aeruginosa* é um problema mundial, a disseminação da resistência ocorre pelo intercâmbio entre os BGN de material genético intra ou entrespécies. Esta pode ocorrer pela perda de porinas, pela presença de proteínas de ligação às penicilinas (PBP's), pela superexpressão de bombas de efluxo e por meio da hidrólise enzimática (NEVES *et al.*, 2011).

*Enterobacter* spp. são BGN não fastidiosos e por vezes encapsulados e podem causar infecções oportunistas em imunocomprometidos, geralmente hospitalizados e contêm uma vasta variedade de mecanismos de resistência a antibióticos. Muitas das cepas de *Enterobacter* contêm ESBL e carbapenemases, incluindo VIM, OXA, metalo- $\beta$ -lactamase-1, e KPC. Estas bactérias são resistentes a quase todos os antimicrobianos disponíveis com exceção da tigeciclina e colistina (CAG *et al.*, 2016).

*E. coli* é um BGN, oxidase negativo, anaeróbio facultativo, coloniza o trato gastrointestinal de seres humanos e animais. É encontrado recorrentemente em IHS, sendo responsável por diversas enfermidades, como infecção do trato urinário, septicemia, pneumonia, meningite neonatal, peritonite e gastroenterite (KHAN *et al.*, 2015). A resistência da *E. coli* as fluoroquinolonas, corriqueiramente empregado no tratamento de infecções do trato urinário, foi disseminada mundialmente, tornando o seu uso terapêutico ineficaz em diversos países para mais da metade dos pacientes (WHO, 2011).

## **Diidropirimidinas (DHP's) e diidropirimidinonas (DHPM's)**

### **Propriedades gerais das DHP e DHPM**

As diidropirimidinas (DHP) são compostos heterocíclicos nitrogenados possuindo dois átomos de nitrogênio nas posições 1 e 3 do anel aromático, como exposto pelo químico italiano Pietro Biginelli, em 1893. O núcleo pirimidina e seus derivados possuem um amplo perfil farmacológico, apresentam variadas propriedades

medicinais e são facilmente encontrados na natureza, além de fácil produção sintética (GODOI *et al.*, 2005; MANSOURI *et al.*, 2012).

Os compostos heterocíclicos da pirimidina estão entre os mais pesquisados, fazendo parte da estrutura molecular de muitos fármacos importantes, tais como: tiamina (vitamina B<sub>1</sub>), ácido barbitúrico e o veranal (hipnóticos), iodoxuridini e trifluridine (antiviral), 5-fluoruracil (anti-câncer), ziduvudine e stavudine (anti-HIV), trimetoprim, sulfametazina e sulfadiazina (antibacteriano), minoxidil e prazosina (anti-hipertensivos), etc. (DANSENA *et al.*, 2015).

As diidropirimidinonas (DHPM's) vêm sendo estudadas, especialmente, após os anos 1980, devido a sua similaridade estrutural com as DHP, destacadas por sua atividade como moduladores do canal de cálcio (MARQUES *et al.*, 2010). A estrutura das DHPM com o radical X= O (oxigênio) está representado na Figura 1.

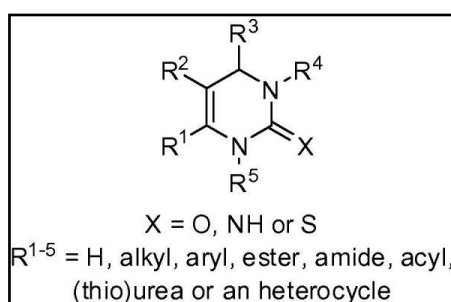


Figura 1 – Estrutura geral de uma Diidropirimidina (DHP).  
Fonte: Sharma *et al.* (2014).

No entanto, há um grande interesse em estudar novos análogos de DHPM's, classe de moléculas que apresenta amplo perfil farmacológico: neuroprotetora, antiparasitária, antiviral, antitumoral, anti-inflamatória e anticancerígena (De FÀTIMA, *et al.*, 2015 ), antimicrobiana, antituberculares, anti-HIV, e agentes antifúngicos (VENUGOPALA, *et al.*, 2016). A aloxana foi o primeiro derivado de pirimidina isolado por Brugnatelli em 1818. Na década de 1990, Pietro Biginelli demonstrou a reação de ciclocondensação (Figura 2) de um acetoacetato de etilo (1), benzaldeído (2) e ureia (3) na presença de um catalisador ácido, produzindo 3,4-di-hidropirimidin-2 (1H) – ona (4). A classe de 1,4- diidropiridinas substituídas foram mencionados pela primeira vez em 1882 por Arthur Hantzsch, verificando-se que as 1,4-diidropiridinas da DHPM tem um papel importante como precursoras na síntese de vários compostos com atividades farmacológicas e têm atraído especial interesse pelos

pesquisadores por apresentarem importante classe de bioativos com propriedades farmacológicas (VIJESH, 2011; DHONGADE *et al.*, 2015).

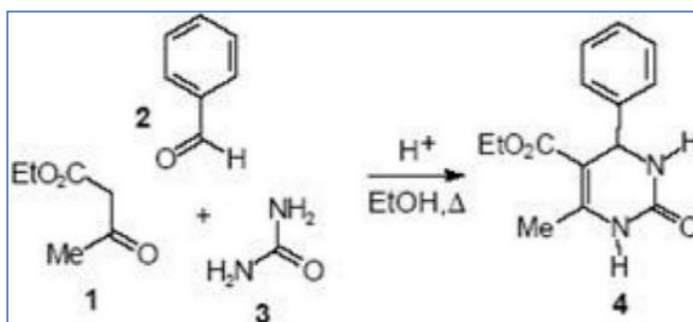


Figura 2 – Síntese das diidropirimidinonas.  
Fonte: Pothiraj *et al.* (2008).

Pesquisas sobre a estrutura relacionada com a atividade farmacológicas das DHPM's mostram que a natureza e a posição dos substituintes no anel de arila de 1,4 diidropirimidina (DHP) determina sua ação farmacológica englobando o núcleo das pirimidinas e podem estar relacionadas com a presença de grupo pirimidina na timina (5), citosina (6) e uracil (7), conforme a Figura 3. As pirimidinas formam os blocos de construção essencial dos ácidos nucleicos DNA e RNA e possuem um vasto espectro de propriedades terapêuticas (SONDHI *et al.*, 2005; SONI *et al.*, 2014).

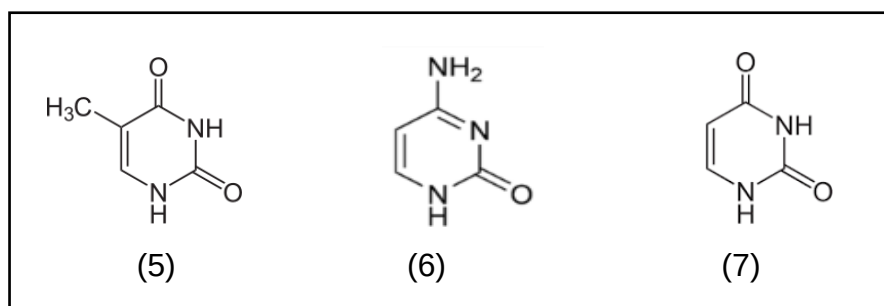


Figura 3 – Estruturas de Pirimidina com tiamina, citosina e uracil.  
Fonte: Adaptada de Sharma *et al.* (2014).

Entre as diversas ações farmacológicas das pirimidinas, a antifúngica, apresenta propriedades farmacológicas representadas pela Flucosina (pirimidina fluorada), que é utilizada como droga em infecções fúngicas sistêmicas graves por *Candida* e *Cryptococcus* e pela Hexetidina, no tratamento de ulcerações aftosa. O Voriconazol é um medicamento dissubstituído e foi submetido a ensaios clínicos

comparativos para estabelecer o seu pleno potencial como um agente antifúngico de amplo espectro (FÁTIMA *et al.*, 2015; SHARMA; CHITRANSHI; AGARWAL, 2014).

Recentemente, o foco da pesquisa das DHPM's foi deslocado do estudo da ação como moduladoras de canal de cálcio para outros análogos biologicamente ativos, como, por exemplo, antagonistas adrenérgicos, utilizados no tratamento da hiperplasia prostática benigna (KAPPE, 2000).

### **Atividade antimicrobiana do anel diidropirimidina (DHP)**

Os antifolatos são fármacos derivados de pirimidinas (2-Amino-4-hidroxipirimidinas) e possuem atividade antagonista do ácido fólico, necessária para a síntese do DNA e RNA na produção e manutenção das novas células (HITCHINGS *et al.*, 1948). Uma ampla gama de 2,4-diaminopirimidinas foi sintetizada como antifolatos provando que essas pirimidinas são inibidoras de diidrofolato redutase (FUTTERMAN, 1957; WERKHEISER, 1961).

O antibacteriano Brodifrim (KOMPIS; WICK, 1977), e o Iclaprim (SCHNEIDER *et al.*, 2003; HAWSER *et al.*, 2006) são inibidores da diidrofolato-seletivo (DHFR) e ativo contra a meticilina e microrganismos resistentes à Vancomicina e ao Trimetoprim), que inibe seletivamente a DHFR bacteriana (CHENG; ROTH, 1982).

Os antibióticos que contém uma porção pirimidina são classificados com base na substituição no anel como *monossustituídos*, *dissustituídos*, *triissustituídos* e *tetrassustituídos*. Os derivados da citosina como o Amicetin de anel pirimidina dissustituído confere atividade antibacteriana contra os CGP e outros microrganismos e os triissustituídos, Plicacetin, o Bacimetrim, considerado o mais simples antimicrobiano desse grupo de pirimidina (5-hidroxi-2-metoxi-pirimidin-4-amina), é ativo contra várias infecções estafilocócicas (REDDICK *et al.*, 2001) e o Gourgetin com atividade contra micobactérias, além de bactérias Gram-positiva e Gram-negativa (SINGH *et al.*, 2003).

A classe dos aminoglicosídeos contém o anel de pirimidina como a Fleomicina, Bleomicina e famílias relacionadas. São antibióticos de amplo espectro, sendo a Bleomicina usada em tumores como linfoma de Hodgkin e câncer testicular (SHARMA; CHITRANSHI; AGARWAL, 2014).

As propriedades antibacterianas dos análogos de DHPM's contendo cloro, nitrogênio e flúor em seus aldeídos aromáticos (R3) figura 1, foram verificadas *in vitro* contra as cepas de *S. aureus*, *E coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *Salmonella typhi* nos análogos da DHPM (CHITRA; DEVANATHAN, 2012).

As características e propriedades farmacológicas das DHPMs sugerem que sua utilização pode ser eficaz no combate às BMR testadas nesse estudo.



## 4 Manuscritos

### **Manuscrito 1 - Multidrug-resistant hospital bacteria: Epidemiological factors and susceptibility profile**

Autores:

Marisa Castro Jara, Andressa Vieira Frediani, Fabiane Knepper Zehetmeyr, Fábio Raphael Pascoti Brunh, Milene Ribeiro Müller, Róger Giusti Miller, Patricia da Silva Nascente

Publicação:

Manuscrito submetido à revista *Microbial Drug Resistance*, conceito Qualis CAPES B1, de acordo com as normas da publicação disponíveis neste *link*: <https://home.liebertpub.com/publications/microbial-drug-resistance/44/for-authors>

**Multidrug-resistant hospital bacteria:**  
**Epidemiological factors and susceptibility profile**  
**Running title:** Multidrug-resistant hospital bacteria

Marisa Castro Jara (marisajara@terra.com.br) <sup>a,b \*</sup>

Andressa Vieira Frediani (dessinhaf@yahoo.com.br)<sup>b</sup>

Fabiane Knepper Zehetmeyr (fkzfernandes@gmail.com)<sup>a</sup>

Fábio Raphael Pascoti Brunh (fabio\_rpb@yahoo.com.br)<sup>c</sup>

Milene Ribeiro Müller (milenermuller@hotmail.com)<sup>d</sup>

Róger Giusti Miller (giustimiller@bol.com.br)<sup>d</sup>

Patricia da Silva Nascente (pattsn@gmail.com)<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Postgraduate Program in Biochemistry and Bioprospecting, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil

<sup>b</sup>Department of Microbiology and Parasitology, Institute of Biology, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil

<sup>c</sup>Departament of Preventive Veterinary Medicine, Federal University of Pelotas, Address: Campus Capão do Leão, Pelotas, RS, Brazil

<sup>d</sup>Clinical Analysis Laboratory, HE-EBSERH, Federal University of Pelotas, Address: Campus Capão do Leão, Pelotas, RS, Brazil

\*Corresponding author. Marisa Castro Jara. marisajara@terra.com.br. Address: Campus Capão do Leão, Avenida Eliseu Maciel, Prédio 31, Zip Code 96010-900. Phone: 055 (53) 981121101.

## Abstract

Increase in antimicrobial resistance to antibiotics is the product of the evolution and natural adaptation of microorganisms through mutations and genetic recombination caused by the indiscriminate use of antibiotics and ineffective measures of infection control and prevention. Current study analyzes the profile of multi-resistant hospital bacteria in two hospitals in Pelotas, state of Rio Grande do Sul, Brazil. In four months, patient's gender and age, hospital accommodation type and sample site were evaluated. Two hundred and eighty-six microbiological culture antibiogram reports of hospitalized patients and outpatients of both sexes, between zero and 96 years old, were analyzed. Bacterium *Klebsiella pneumoniae* was the most prevalent. The most resistant Gram-negative bacilli (GNB) were *Klebsiella pneumoniae* (27.5%); *Acinetobacter baumannii* (24.1%); *Escherichia coli* (14.7%); *Pseudomonas aeruginosa* (14.5%). The most resistant Gram-positive cocci (GPC) were *Enterococcus faecium* (27.5%) and *Staphylococcus aureus* (25.5%). The classes of antibiotics with the highest number of resistant GNB were penicillins (84.8%), quinolones (77.5%) and cephalosporins (75.7%). In the case of GPC, the most resistant were macrolides (95.4%); lincosaminase (90.3%) and penicillins (77%). Among GNBs, polypeptides, with 81.3%, had the greatest sensitivity rate, whilst, among GPC, fusidanes, glycyglycines and lipopeptides had 100% sensitivity.

**Keywords:** Hospital infection; Infections Related to Health Assistance; MDR; antibiotics; epidemiology.

## Introduction

In a survey commissioned by the UK government, O'Neil<sup>1</sup> estimated that by 2050 about 10 million people will die annually from infections caused by bacteria with multiple resistance genes. These mortality data are higher than those for cancer, with approximately 8.2 million people per year. This prediction, however, has been questioned by such authors as De Kraker et al.<sup>2</sup>, who considers it overestimated.

Bacterial resistance to antibiotics has been found particularly in bacterial pathogens ESKAPEEc (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp* and *Escherichia coli*) and are the main cause of nosocomial infections <sup>3,4,5,6,7</sup>. Gram-positive cocci (GPC), such as *E. faecium* and *S. aureus*, have proved to be resistant to antimicrobial drugs, promoting severe and lethal infections such as pneumonia, meningitis and skin infections <sup>8</sup>. Multi-resistant Gram-negative bacilli (GNB), such as *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *Enterobacter spp.*, have repeatedly caused infections of the urinary tract, blood (sepsis), pneumonia, meningitis, diarrhea, gonorrhea, otitis, ocular infections, intra-abdominal or wound infections, as well as infections caused by central venous catheters <sup>9</sup>.

Whereas several studies have been carried out in the United States <sup>10,11,12</sup> on multi-resistant drugs in hospital, publications on the subject in Brazil are relatively few <sup>13,14,15,16,17</sup>. Moreover, in southern Brazil, they seem to be limited to surveys conducted in Santa Maria RS Brazil<sup>18</sup>. Since a controversy on estimates exists among researchers, it seems relevant to produce specific and localized studies on the state of bacterial resistance for further epidemiological information on the debate.

Current analysis discusses the susceptibility profile of multi-resistant bacteria from two hospitals in Pelotas RS Brazil, with regard to epidemiological factors (patient data, sample origin and site of action).

## Materials and methods

Current study was approved by the Committee of Ethics on Research (CER) n. 2,961,379, 2,985,372 and by the National Committee on Research Ethics, n. 2,880,831 (Plataforma Brasil).

A study was performed in two hospitals in Pelotas RS Brazil, between October 2018 and January 2019, comprising 286 antibiogram reports of patients hospitalized in Intensive Care Units (ICUs), Neo Natal Intensive Care Units (NICs), Wards (WARs), private and health insurance schemes (PHIs) and outpatients (OPTs), of both genders, divided into age-groups: NB (newborns); 14-19 years; 20-49 years; 50-59 years; 60-69 years and over 70 years.

The study was carried out in the municipality of Pelotas, state of Rio Grande do Sul, southern region of Brazil. According to the Brazilian Institute of Geography and Statistics (in Portuguese “Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística” (IBGE)<sup>19</sup>), Pelotas has a 2018 estimated population of 341,648 in 2018, with a population density of 203.89 inhabitants per km<sup>2</sup>.

The estimated sample number (n) was based on the formula  $n = [Np(1-p)] / [(d^2/Z^2(1-\alpha/2)^2 + p(1-p))]$ <sup>20</sup>, considering an expected frequency (p) of 80 (d), a maximum error (d) of 5%, and a population considered infinite (N), which resulted in a minimum sample number of 246 people to represent the population of the city. However, 286 people were evaluated to increase the reliability of the information obtained.

Bacterial isolates, collected from lung, abdominal, skin, blood and urine samples, proved resistant against at least three classes of antibiotics. The identification of bacterial isolates and their susceptibility profiles against standard antibiotics were performed by the Clinical Analysis Laboratories of each hospital under analysis, by automated VITEK® 2 system (bioMérieux, France) and BD PHOENIX, according to recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)<sup>21</sup>.

Tested antibiotics were distributed into the following classes (16): Quinolones (Nalidixic acid (NAL); Levofloxacin (LEV); Moxifloxacin (MFX); Norfloxacin (NOR); Çiprofloxacin (CIP)); Sulfonamides (Sulfamethoxazole-trimetroprin (SUT)); Penicillins: (Ampicillin (AMP); Penicillin (PEN); Oxacillin (OXA)); Cephalosporins (cephalexin (CFL); Cefoxitin (CFO); Cefuroxime (CRX); Ceftriaxone (CRO); Cefepime (CPM); Cefotaxime (CTX), Cefazoline (CFZ); Ceftazidime (CAZ); Ceftaroline (CPT)); Carbapenems (Imipenem (IPM), Meropenem (MER); Ertapenem (ETP)); Inhibitors of  $\beta$ -lactamases (Ampicillin/sulbactam (ASB), Ampicillin/clavulanic acid (AMC), Piperacillin/tazobactam (PIT)); Polypeptides (Colistin (CLS)); Glycylcyclines (Tigecycline (TGC)); Nitrofurans (Nitrofurantoin (NIT)); Aminoglycosides (Amikacin (AMI), Streptomycin (ETR), Gentamicin (GEN)); Glcopeptides (Teicoplanine (TEI), Vancomycin (NPV)); Macrolides (Erythromycin (ERI)); Oxalidinones (Linozilide (LNZ)); Lincosamines (Clindamycin (CLI)); Rifampicins (Rifampicin (RIF)); Tetracyclines (Minocycline (MNO)); Fusidans (Fusic acid (AFD)); Lipopeptide (Daptomycin (DAP)).

Descriptive statistical analyses were carried out to determine resistance distribution to antibiotics, most affected age brackets, gender, sample origin and site of performance, with SPSS statistical software 20.0.

## Results

The reports of 286 patients were analyzed. Patients were distributed into two hospitals (Hospital A with 128 patients and Hospital B with 158 patients), during a 90-day period, with age ranging between zero (NB) and 96 years, distributed into the following age brackets: 0-2 years (24.1%), 50-59 years (17.1%), 60-69 years (20.3%), and over 70 years (31.8%). Further, 156 (54.5%) were males and 118 (41.3%) were females; 12 (4.2%) were gender non-identified.

Mean age was  $58.2 \pm 21.5$  years, but most patients (52.1%) were over 60 years old and 54.5% were male. Data on origin of sample by place of hospitalization comprised WAR 55.0%; ICU 23.4%; OPT 10.2%; PHI 6.6%; NIC 4.2%. Data on infection sites comprised urine (40.6%); lungs (30%); blood (18.2%); skin (10.5%); abdomen (0.7%).

Isolated and identified multi-resistant bacteria were 51 (17.80%) *K. pneumoniae*; 46 (16.08%) *A. baumannii*; 22 (7.70%) *S. aureus*; 20 (7.00%) *P. aeruginosa*; 20 (7.00%) *Enterobacter* spp.; 6 (2.10%) *E. faecium* and 44 (15.38%) *E. coli*, belonging to the ESKAPEEc group; 16 (5.59%) *Staphylococcus* coagulase negative, 8 (2.80%) *Citrobacter freundii* and 8 (2.80%) *Staphylococcus haemolyticus*, 7 (2.45%) *Staphylococcus epidermidis*, 6 (2.10%) *Staphylococcus hominis*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens* and *Morganella morganii* 5 (1.75%) each; *Providencia rettgeri* and *Stenotrophomonas maltophilia* 4 (1.40%) each; *Aeromonas sobria*, *Shigella flexneri*, *Proteus vulgaris* and *Streptococcus* sp. 1 (0.35%) each, not belonging to the group. Table 1 shows the patients' epidemiological data, place of hospitalization and site of action, with regard to bacteria reported.

When bacterial genera (GPC and GNB) are taken into account, the former showed resistance to at least three and, at the most, ten antibiotics, within each class of antibiotics; the latter tested to at least four and, at the most, 18 antibiotics, within each class.

Antibiotic classes with the greatest number of resistant CNB were penicillins (84.8%), quinolones (77.5%) and cephalosporins (75.7%). In the case of GPC, the most resistant were macrolides (95.4%); lincosaminase (90.3%) and penicillins (77%). Among the GNBs, polypeptides (81.3%) and glycylicyclines, tested only for tigecycline (64%), and aminoglycosides, tested for amikacin and gentamicin (61.9%), showed greater sensitivity; among the GPCs, fusidanes, glycyglycines and lipopeptides tested (100%) (Table 2).

Bacteria with greatest resistance to antibiotic classes among GNB and GPC (286) were *K. pneumoniae* (N=51; 27.5%), *A. baumannii* (N=46; 24.1%), *E. coli* (N=44; 14.7%) and *P. aeruginosa* (N=20; 14.5%) (Table 3).

#### *Limitations of current study*

Several limitations have been detected in current study. The period of data collection has not been taken into account. In a longitudinal study, the region's seasonal differences, with distinct climatic features, could be identified by Infections Related to Health Assistance (in Portuguese "IRAS"), with a better delineation according to infections in each. Further, the hospitals studied reports on newborns solely by the mother's name, without explicitly mentioning the gender of the newborn. Since 3.8% of the cases analyzed in current study failed to present gender classification, a more precise result with regard to gender was not possible.



## Discussion

Data revealed that males and age group over 60 years were predominant targets in infections with multi-resistant bacteria, suggesting immunodepressed patients. Results are compatible with other Brazilian studies, such as those by Lorenzoni et al.<sup>18</sup> who detected a higher occurrence in males (52.1%) and in over-60-years-old age bracket (51.3%), and by Souza et al.<sup>17</sup> (41.1%) who reported higher occurrence rates in people aged 80 years or older (62.2%), and by Seibert et al.<sup>16</sup> who registered higher rates in males (72.3%) and in people over 60 years (57.5%). An international study by Cek et al.<sup>22</sup> identified male predominance (70.4%) and 59.9±18.2 years old.

Another relevant aspect in current study is the place of hospitalization. A study by Ahn and Prince<sup>23</sup> demonstrated that ICUs were environments with the highest rates for IRAS. In fact, ICUs are high risk environments involving immunosuppressed patients, invasive procedures, such as mechanical ventilation and catheters, prolonged hospitalization, the presence of opportunistic microorganisms capable of forming biofilms, and others. In current study, the predominant place of hospitalization was WAR, with 55.0%, followed by adult ICU, with 23.4%, and OPTs, with 10.2%; PHI and NIC featured lower rates, respectively, 6.6% and 4.2 %. In the case of PHI, results may be related to the fact that, at most, two patients are hospitalized per ward, with a decrease in cross contamination between patients and caregivers. Low rates in NIC are linked to the small number of patients surveyed. Results differ from those in most Brazilian studies which reported that a greater spread of multi-resistant bacteria (BMR) occurred in ICUs, with 17.7%<sup>18</sup> and 25.6%

The urinary tract is the predominant site of IRAS activity, with 40.6%, mainly due to infection by *E. coli* with a higher frequency rate of 31 isolates, with 85.7% prevalence in urine, followed by *K. pneumoniae* with 30 isolates (56.6%). Vincitorio et al.<sup>24</sup> insisted that urinary infections, due to the use of catheters, are a recurring cause of hospital infections worldwide. According to these authors, the main risk factors associated with these infections are elderly patients, abnormalities of urinary functions, immunosuppression, prolonged hospitalization, inadequate use of catheters, in many cases, even without adequate medical indication.

At the international level, a 12-year study by Arana et al.<sup>10</sup> also identified that urinary infections rated above 30%. On the other hand, Cek et al.<sup>22</sup> identified asymptomatic bacteriuria and cystitis as the most frequent urinary infections, with 27 and 26%, respectively. The other sites of action identified by current study as more frequent were lung (30.0%), blood (18.2%), skin (10.5%) and liquids (0.7%). Another Brazilian study by Lorenzoni et al.<sup>18</sup> found similar results to ours, with the following rates: urinary infections (38.0%), pulmonary infections (21.6%), rectal infections (18.0%) and blood infections (5.3%). However, Seibert et al.<sup>16</sup> forwarded different results and pinpointed tracheal aspirates as predominant (25.5%).

Current study identified bacterial species *K. pneumoniae* (17.8%), *A. baumannii* (16.4%) and *E. coli* (15.0%) as prevalent among GNBs. Seibert et al.<sup>16</sup> reported that GNB, which produce the  $\beta$ -lactamase enzyme called Extended Spectrum Betalactamases (ESBL), are highly resistant to  $\beta$ -lactam class due to the inactivation of the antibiotic by the break of the  $\beta$ -lactam ring. Our study showed 32.3% of ESBL-producing bacteria, with the highest occurrence rate for *K. pneumoniae* (15.0%) and *E. coli* (14.6%). Studies by Yayan et al.<sup>11</sup> have shown that the prevalence of these isolates is constant in other countries. They reported that *K.*

*pneumoniae* is one of the most frequent of the genus *Klebsiella* in IRAS and in community infections in patients with pneumonia in the Germany. In a 10-year survey, Liu et al.<sup>25</sup> identified bacteria *E. coli* (47.0%), *Klebsiella* spp. (26.3%), *Salmonella* spp. (10.4%) and *Enterobacter* spp. (9.2%) as prevalent. It has also been observed that ESBL detection rates were predominant in the same bacteria (*E. coli* and *K. pneumoniae*) in current study, with the following percentages *E. coli* 68.9% (2004-2005), 73.2 (67%), 72.6% (2011-2012) and 58.4% (2013-2014), and *K. pneumoniae* with 75.9%, 50%, 0%, 41.4%, 40.2% and 43.0%, respectively, at the same intervals.

Research by Rossi et al.<sup>15</sup>, conducted in the city of São Paulo for four years, indicated *Enterobacteriaceae* as the most frequent isolates, with the following percentages: *K. pneumoniae* (49%), *Pseudomonas* spp. (29%) and *Acinetobacter* spp. (22%). Research in Londrina, PR, Brazil, by Souza et al.<sup>17</sup> demonstrated that the *K. pneumoniae* was the most prevalent MDRs at hospital discharge (19.0%) and at death (21.2%). *A. baumannii* (18.5%) ranked second in patients who died, whereas *P. aeruginosa* (11.3%) was highly frequent in hospital-discharged patients. Research conducted in the state of Rio Grande do Sul, Brazil, by Lorenzoni et al.<sup>18</sup>, who only studied the occurrence of *K. pneumoniae* in urine samples, forwarded the following percentages: 43.4% in 2015 and 56.6% in 2016.

Carbapenems are last-resort broad-spectrum antibiotics for the treatment of IRAS in GNB and for ESBL bacteria when they are resistant to multiple drugs and to other  $\beta$ -lactams (penicillins and cephalosporins). Although resistance to antibiotics by *P. aeruginosa* is a worldwide problem, Dantas et al.<sup>13</sup> concluded that the high incidence of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* is more significant in Brazil due to the frequent use of these drugs resistant to glycopeptides. In current study, *A.*

*baumannii* (33.1%), *K. pneumoniae* (23.4%) and *P. aeruginosa* (19.9%) were greatly resistant to carbapenems, while *E. coli* demonstrated special sensitivity to them. These results corroborate those by Oliveira et al.<sup>14</sup>, who conducted surveys in a hospital in Brazil between 1999 and 2008. The authors insisted that bacteria *A. baumannii*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* were the most resistant to carbapenems. Oliveira et al.<sup>14</sup> also detected an increase in the resistance of *A. baumannii* to antibiotics, with 7.4% at the start of the study and 57.5% at the end.

Within the context of international research on the subject, a retrospective study by Micek et al.<sup>12</sup>, performed in 12 hospitals in five countries, showed a high prevalence of MDR (30.5%), and demonstrated a 15-fold increase in *P. aeruginosa* index when compared to other carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. Micek et al.<sup>12</sup> listed the following percentages on *P. aeruginosa*: United States (21.0%), France (39.6%), Italy (42.1%), Germany (49.9%) and Spain (52.8%). In a study carried out in a school hospital in the south of the state of Rio Grande do Sul, Brazil, Seibert et al.<sup>16</sup> found that *K. pneumoniae* was the most resistant bacterium to carbapenems. In a research by Liu et al.<sup>25</sup> conducted in Beijing, China, carbapenems were the most effective antibiotic classes against *Enterobacteriaceae*, followed by moxalactam, tigecycline and amikacin. However, an increase in resistance to the class of carbapenems in all species studied has been detected, especially *K. pneumoniae* (a 10.6% increase for imipenem) and *Enterobacter aerogenes* (a 21.1% increase for imipenem). Sensitivity decrease to carbapenems enhanced the reuse of other antibiotics (tigecycline and polymyxins) that showed good *in vitro* activity against *Enterobacteriaceae*.

Pereira-Maia et al.<sup>26</sup> noted that tetracyclines and glycylcycline (analogous to tetracycline) are some of the few effective antibiotics currently available in the

treatment of infections caused by methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). In the case of the glycyglycine class, current study revealed that GNBs had a 64.0% sensitivity to tigecycline. In fact, it was the only antibiotic of this class to be tested and the most effective (40.4%) in the control of infections caused by *A. baumannii*. All bacteria tested (100%) among the GPCs were sensitive to glycyglycines, whereas only 28% had any sensitivity to tetracyclines. On the other hand, the *S. aureus* isolate among the GPCs showed any sensitivity to tigecycline (18.0%) and minocycline (35.7%). Consequently, our conclusions are compatible with those by Lorenzoni et al.<sup>18</sup> who showed a 66.1% bactericidal sensitivity to tigecycline. Seibert et al.<sup>16</sup> also reported almost similar rates (69.4%) in tigecycline sensitivity.

Durante-Mangoni et al.<sup>27</sup> pointed out that the bactericidal effect of aminoglycosides is due to their binding to the 30S subunit of bacterial ribosomes, preventing their movement along the mRNA and disrupting protein synthesis. The authors, however, recommended the moderate use of aminoglycosides, due to their ototoxic and nephrotoxic effects. They also emphasized their efficacy against aerobic GNB, such as *P. aeruginosa*, due to their synergistic effect with  $\beta$ -lactams. In current investigation, *A. baumannii* (45.9%), *K. pneumoniae* (18.0%) and *P. aeruginosa* (16.4%) were the bacteria with the highest sensitivity rate to aminoglycosides (gentamicin and amikacin) in GNB. On the other hand, *S. aureus* (61.1%) and *S. coagulase* negative bacteria (22.2%) showed the best antimicrobial activity results in this class, with 61.5% in GNB and 60.5% in GPC. Other Brazilian studies on the subject were developed by Seibert et al.<sup>16</sup> and Lorenzoni et al.<sup>18</sup>. The former showed a 91.5% sensitivity to amikacin and 57.4% to gentamicin, whilst the latter presented 78.6% and 64.9% sensitivity results for amikacin and gentamicin, respectively. Seibert et al.<sup>16</sup> demonstrated that aminoglycosides are an alternative in the treatment

of carbapenem-resistant *Enterobacterales*, indicating that ampicillin, gentamicin and tigecycline are not recommended for serious systemic infections, and that monotherapy is not indicated due to increased microbial resistance. A study by Micek et al.<sup>12</sup> forwarded the following sensitivity indexes to aminoglycosides, namely, United States (80.2%), France (39.6%), Italy (75.2%), Spain (58.9%) and Germany (58.3%). Results by Micek et al.<sup>12</sup> are partially compatible with current ones, with approximate rates for Spain and Germany and discordant for US, Italy and France.

It should be underscored that the use of colistin was abandoned during the 1970s due to its toxicity and low renal clearance, but its use was retaken as the last therapeutic option in the treatment of MDR. The reuse of colistin has produced an increase in the resistance of bacteria to therapeutic efficacy worldwide, due to genetic mutations, by the *mcr-1* gene, as pointed out by Wang et al.<sup>28</sup> and Rossi et al.<sup>15</sup>. Current study only tested the action of colistin among the class of polypeptides, revealing higher sensitivity (81.3%) among all antibiotic classes. The most sensitive bacterium was *A. baumannii* (45.9%). Contrastingly, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* had a 28.6% increased rate of resistance to colistin each. In Brazil, studies by Rossi et al.<sup>15</sup> showed that *Enterobacteriaceae* isolates had an increase in resistance rates to colistin, from 6.6% (N=111) in 2010 to 9.4% (N=383) in 2014. The same authors observed that *K. pneumoniae* had a critical index, or rather, an 84.1% resistance to colistin. This fact did not occur among non-fermentative isolates, such as *Acinetobacter* spp. (1.4%) and *Pseudomonas* spp. (4.0%), which are still very susceptible to colistin. Results by Lorenzoni et al.<sup>18</sup>, being compatible with our, indicating that all *K. pneumoniae* isolates had increased resistance to colistin (239.3%). Lorenzoni et al.<sup>18</sup> concluded that these results are a source of concern since colistin is widely used in combating the carbapenem-resistant

*Enterobactereaceae* combined to amikacin. An international study by Prim et al.<sup>29</sup> detected a 0.67% resistance to colistin and underscored that the most resistant bacteria were *Enterobacter cloacae* (4.2%), *E. coli* (0.5%) and *K. pneumoniae* (0.4%). Furthermore, one third of the isolates were resistant to multiple drugs and 89% of the patients tested did not previously receive colistin.

Yayan et al.<sup>11</sup> argue that, after its discovery 82 years ago, penicillin has been widely used in combating the most varied types of bacterial infections. GNB from the *Enterobacteriaceae* family have become resistant to penicillin because they produce  $\beta$ -lactamase enzymes that degrade the  $\beta$ -lactam ring. The development of penicillinase enzymes in gram-positive and gram-negative bacteria led to the production of new  $\beta$ -lactams, the cephalosporins. In current study, MDR showed resistance to the class of penicillins, in GN (84.8%), and in GP (77.4%), according to Table 2. Zhang et al.<sup>30</sup> revealed that between 2012 and 2016 there was a high bacterial resistance to penicillins with lower susceptibility in *S. aureus*, reported worldwide only at 14.7% for penicillin. The following indices were described for Africa with 2.3%; Asia, with 6.0%; Europe, with 15.9%; North America, with 16.6%, and Latin America, with 8.1%. The susceptibility of *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* was 12.9 and 11.9% for penicillin and ampicillin, respectively. The overall rate for penicillin-resistant *S. pneumoniae* isolates (PRSP) was 9.0% worldwide. According to continents, rates were as follows: Asia, with 25.8%; Africa, with 13.0%; Latin America, with 11.8%; North America, with 9.6% and Europe, with 7.5%.

Cephalosporins are four-generation  $\beta$ -lactam class drugs. The first generation was effective in combating GPC, especially recommended in the treatment of *S. aureus* and Streptococcus, when penicillin could not be prescribed. The second generation (cephalosporins) gave good results against GNB. The third and fourth

generation of cephalosporins, belonging to the class of oximinocephalosporins, showed a spectrum and power increase against GNB. Current results on the cephalosporins class indicated *K. pneumoniae* (24.6%), *A. baumannii* (22.7%) and *E. coli* (18.7%) as the bacteria with the greatest resistance. On the other hand, GNB demonstrated a 75.7% resistance to cephalosporin, while GPC showed 54.2% sensitivity to this class. Ali et al.<sup>31</sup> pointed out that resistance to four generations of cephalosporins ranged between 54% and 80.4%. Consequently, frequent use of cephalosporin is linked to the selection of ESBL producers in different regions. Studies by Cek et al.<sup>21</sup>, in turn, showed high rates of resistance to cephalosporins (35-50%).

Studies by Dalhoff<sup>32</sup> and Arana et al.<sup>10</sup> noted that quinolone resistance was reported for the first time in *S. aureus*, particularly MRSA and *P. aeruginosa*. Resistance to fluoroquinolone, such as ciprofloxacin and levofloxacin, was initially detected in hospitals in GP and GN bacteria. Since the 1960s, fluoroquinolones have been shown to be less effective in combating urinary, respiratory, gastrointestinal, urogenital, intra-abdominal and skin infections due to increased bacterial resistance by ESBL production in *Enterobacteriaceae*. Consequently, *E. coli*, frequently treated with fluoroquinolones, has been indicated as being especially relevant in urinary and gastrointestinal infections.

GNB resistance has been observed in 77.5%, with high prevalence rates in *K. pneumoniae* (28.2%), followed by *A. baumannii* (26.4%) to the quinolone class. A 74.5% general resistance of isolates has been shown in GP, with greater resistance in *Staphylococcus coagulase* negative (48.1%) to quinolones. A study by Ali et al.<sup>31</sup> (N=91; 61%), exhibiting bacterial resistance to ciprofloxacin, esparfloxacin, levofloxacin and norfloxacin, stood at 60%, 59%, 58% and 57% respectively. In their



2003-2010 study, Cek et al.<sup>21</sup> reported lower rates of resistance to fluoroquinolones (26.6%), with high resistance rates to ciprofloxacin (>50%). A study by Lorenzoni et al.<sup>18</sup> showed increased resistance of *K. pneumoniae* to ciprofloxacin (68%).

## Conclusions

Current study performed in two hospitals in Pelotas, RS, Brazil, showed that bacterial resistance was prevalent among male patients, older than 60 years, hospitalized in wards, with the urinary tract as the predominant site of action.

Most GNB causing IRAS were *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. These bacteria were especially resistant to the following classes of antibiotics: penicillin, quinolones and cephalosporin. In the GPC group, *Staphylococcus aureus*, negative *Staphylococcus coagulase* and *Staphylococcus haemolyticus* showed the highest resistance rates to macrolides, lincosamines and glycoprotein.

The classes of penicillins, quinolones and cephalosporin were ineffective in the treatment of infections caused by GNB, especially in the urinary tract, among patients over 70 years of age (male patients admitted to nursing homes). In the case of penicillin, lincosamin and macrolide classes, the highest resistance of GPC occurred predominantly in relation to blood infections, among men over 70 years of age, hospitalized in wards.

## Acknowledgements

The authors would like to thank the Laboratories of Clinical Analyses and the Administrators of the two Hospitals in Pelotas RS Brazil, for providing the clinical

reports employed in current study and for the bacterial isolates that would be of use in further studies.

### **Author Disclosure Statement**

No competing financial interests exist.

### **Funding sources**

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

### **References**

- <sup>1</sup> O'Neil, J. 2014. Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations. The Review on Antimicrobial Resistance, London, UK.
- <sup>2</sup> De Kraker, M.E.A., A.J. Stewardson, and S. Harbarth, S., 2016. Will 10 Million People Die a Year due to Antimicrobial Resistance by 2050? PLoS Medicine. 13:e1002184.
- <sup>3</sup> Argudín, M.A., A. Deplano, A. Meghraoui, M. Dodémont, A. Heinrichs, O. Denis, C. Nonhoff, and S. Roisi. 2017. Bacteria from animals as a pool of antimicrobial resistance genes. Antibiotics. 6:12.
- <sup>4</sup> Brogan, D.M., and E. Mossialos. 2013. Incentives for new antibiotics: The Options Market for Antibiotics (OMA) model. Globalization and Health. 9:58.
- <sup>5</sup> Bassetti, M., and E. Righi, E. 2015. Development of novel antibacterial drugs to combat multiple resistant organisms. Langenbecks Arch. Surg. 400:153-65.
- <sup>6</sup> De Angelis G, B. Fiori, G. Menchinelli, T. D'Inzeo, F.M. Liotti, G.A. Morandotti, M. Sanguinetti, B. Posteraro, and T. Spanu. 2018. Incidence and antimicrobial

resistance trends in bloodstream infections caused by ESKAPE and *Escherichia coli* at a large teaching hospital in Rome, a 9-year analysis (2007–2015). *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 37:1627-1636.

<sup>7</sup> Santajit, S., and N. Indrawattana. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Biomed Res. Int.* 2016:2475067.

<sup>8</sup> Steenackers, H.P., I. Parijs, K.R. Foster, and J. Vanderleyden. 2016. Experimental evolution in biofilm populations. *FEMS. Microbiology Rev.* 40:373-397.

<http://dx.doi.org/10.1093/femsre/fuw002>

<sup>9</sup> Exner, M., S. Bhattacharya, B. Christiansen, J. Gebel, P. Goroncy-Bermes, P.

Hartemann, P. Heeg, C. Ilchner, A. Kramer, E. Larson, W. Merckens, M. Mielke, P.

Oltmanns, B. Ross, M. Rotter, R.M. Schmithausen, H.-G. Sonntag, and M.

Trautmann. 2017. Antibiotic resistance: What is so special about multidrug-resistant Gram-negative bacteria? *GMS. Hyg. Infect. Control.* 12.

<sup>10</sup> Arana, D.M., M. Rubio, and J.-I. Alós. 2017. Evolution of antibiotic multiresistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from urinary tract infections: A 12-year analysis (2003–2014). *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 35:293-298.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2016.02.018>

<sup>11</sup> Yayan, J., B. Ghebremedhin, and K. Rasche. 2015. No Carbapenem Resistance in Pneumonia Caused by *Klebsiella* Species. *Medicine (Baltimore).* 94:e527.

<sup>12</sup> Micek, S.T., R.G. Wunderink, M.H. Kollef, C. Chen, J. Rello, J. Chastre, M.

Antonelli, T. Welte, B. Clair, H. Ostermann, E. Calbo, A. Torres, F. Menichetti, G.E.

Schramm, V. Menon. 2015. An international multicenter retrospective study of

*Pseudomonas aeruginosa* nosocomial pneumonia: impact of multidrug resistance.

*Critical Care.* 19:219. <http://dx.doi.org/10.1186/s13054-015-0926-5>

- <sup>13</sup> Dantas, R.C.C., R.T.E. Silva, M.L. Ferreira, I.R. Gonçalves, B.F. Araújo, P.A. Campos, S. Royer, D.W.D.F. Batistão, P.P. Gontijo-Filho, R.M. Ribas. 2017. Molecular epidemiological survey of bacteremia by multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*: the relevance of intrinsic resistance mechanisms. PLoS One. 12:e0176774. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0176774>
- <sup>14</sup> Oliveira, V.D.C., F.G. Rubio, M.T.G. Almeida, M.C.L. Nogueira, and A.C.C. Pignatari. Trends of 9,416 multidrug-resistant Gram-negative bacteria. Rev. Assoc. Med. Bras. 61:244-249.
- <sup>15</sup> Rossi, F., R. Girardello, A.P. Cury, T.S.R. Di Gioia, J.N. Almeida Jr., and A.J. Duarte. 2017. Emergence of colistin resistance in the largest university hospital complex of São Paulo, Brazil, over five years. Braz. J. Infect. Dis [Internet]. 21:98-101. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2016.09.011>
- <sup>16</sup> Seibert, G., R. Hhörner, B.H. Meneghetti, R.A. Righl, N.L.F.D. Forno, and A. Salla. 2014. Nosocomial infections by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing enterobacteria in a teaching hospital. Einstein (São Paulo). 12:282-286. <http://dx.doi.org/10.1590/S1679-45082014AO3131>
- <sup>17</sup> Souza, E.S., R.A. Belei, C.M.D. Carrilho, T. Matsuo, S.F. Yamada-Ogatta, G. Andrade, M.R.E. Perugini, F. M. Pieri, E.M. Dessunti, G. Kerbaux. 2015. Mortality and risks related to healthcare-associated infection. Texto Contexto - Enferm. 24:220-228. <http://dx.doi.org/10.1590/0104-07072015002940013>.
- <sup>18</sup> Lorenzoni, V.V., R.F. da Costa, R.R. Filipini, and H. Rosmari. 2018. Increased antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae* from a University Hospital in Rio Grande do Sul, Brazil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. [Internet]. 51:676-679. <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0362-2017>

- <sup>19</sup> Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). 2018. Estimativas da população residente para os municípios e para as unidades da federação com data de referência em 1º de julho de 2018. IBGE, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.
- <sup>20</sup> Dean, A.G., K.M. Sullivan, and M.M. Soe. 2019. OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health, version 3.01a.
- <sup>21</sup> Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2012. Reference method of Broth. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests of or bacteria that grow aerobically. Approved Standard — Ninth Edition, NCCLS Document M07-A9, CLSI, Wayne, PA.
- <sup>22</sup> Cek, M., Z. Tandoğdu, F. Wagenlehner, P. Tenke, K. Naber, and T.E. Bjerklund-Johansen. 2014. Healthcare-associated urinary tract infections in hospitalized urological patients—a global perspective: results from the GPIU studies 2003–2010. *World J. Urol.* 32:1587–1594. <http://dx.doi.org/10.1007/s00345-013-1218-9>
- <sup>23</sup> Ahn, D., and A. Prince. 2017. Host-pathogen interface: progress in understanding the pathogenesis of infection due to multidrug-resistant bacteria in the intensive care unit. *J. Infect. Dis.* 215:S1-S8. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiw405>
- <sup>24</sup> Vincitorio, D., P. Barbadoro, L. Pennacchietti, I. Pellegrini, S. David, E. Ponzio, and E. Prospero. 2014. Risk factors for catheter-associated urinary tract infection in Italian elderly. *Am. J. Infect. Control.* 42:898-901.
- <sup>25</sup> Liu, X.J., Y. Lyu, Y. Li, F. Xue, and J. Liu. 2017. Trends in Antimicrobial Resistance against Enterobacteriaceae Strains Isolated from Blood: A 10-year Epidemiological Study in Mainland China (2004-2014). *Chin. Med. J.* 130:2050–2055. <http://dx.doi.org/doi:10.4103/0366-6999.213407>

- <sup>26</sup> Pereira-Maia, E.C., P.P. Silva, W.B. Almeida, H.F. Santos, B.L. Marcial, R. Ruggiero, and W. Guerra. 2010. Tetraciclinas e glicilciclinas: uma visão geral. *Química Nova*. 33:700-706. <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422010000300038>
- <sup>27</sup> Durante-Mangoni, E., A. Grammatikos, R. Utili, and M.E. Falagas. 2009. Do we still need the aminoglycosides? *Int. J. Antimicrob. Agents*. 33:201–205. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.ijantimicag.2008.09.001>
- <sup>28</sup> Wang, R., L. Van Dorp, L.P. Shaw, P. Bradley, Q. Wang, X. Wang, L. Jin, Q. Zhang, Y. Liu, A. Rieux, T. Dorai-Schneiders, L.A. Weinert, Z. Iqbal, X. Didelot, H. Wang, F. Balloux. 2018. The global distribution and spread of the mobilized colistin resistance gene *mcr-1*. *Nat. Commun*. 9:1179.
- <sup>29</sup> Prim, N., M. Turbau, A. Rivera, J. Rodríguez-Navarro, P. Coll, and B. Mirelis. 2017. Prevalência da resistência à colistina em isolados clínicos de Enterobacteriaceae: estudo transversal de quatro anos. *J. Infect*. 75:493–498. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2017.09.008>
- <sup>30</sup> Zhang, Z., M. Chen, Y. Yu, S. Pan, and Y. Liu. 2018. Antimicrobial susceptibility among gram-positive and gram-negative blood-borne pathogens collected between 2012-2016 as part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial. *Antimicrob. Resist. Infect. Control*. 7:152.
- <sup>31</sup> Ali, I., Z. Rafaque, S. Ahmed, S. Malik, and J.I. Dasti. 2016. Prevalence of multi-drug resistant uropathogenic *Escherichia coli* in Potohar region of Pakistan. *Asian Pac. J. Trop. Biomed*. 6:60–6.
- <sup>32</sup> Dalhoff, A. 2012. Global fluoroquinolone resistance epidemiology and implications for clinical use. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis*. 2012:976273. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/976273>

Table 1. Epidemiological profile of patients with regard to multi-resistant bacteria in two hospitals in Pelotas RS Brazil, 2018-2019

| Bacteria (N)                                  | Age bracket   | Gender    | Place of origin in hospital            | Origin of sample           |
|-----------------------------------------------|---------------|-----------|----------------------------------------|----------------------------|
|                                               | (%)           | (%)       | (%)                                    | (%)                        |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> (46)           | >70 (36.2)    | M (53.2)  | ICU (51.1)                             | lung (66.0)                |
| <i>Aeromonas sobria</i> (1)                   | 60-69 (100.0) | M (100.0) | WAR (100.0)                            | urine (100.0)              |
| <i>Citrobacter freundii</i> (8)               | 20-49 (85.7)  | F (71.4)  | OPT (71.4)                             | urine (85.7)               |
| <i>Enterobacter</i> spp. (20)                 | >70 (40.0)    | F (60.0)  | WAR (60.0)                             | urine (55.0)               |
| <i>Escherichi coli</i> (44)                   | 20-49 (31.8)  | M (63.6)  | WAR (68.2)                             | urine (70.5)               |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> (5)                 | >70 (100.0)   | M (66.7)  | WAR (100.0)                            | lung (66.7)                |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> (51)             | >70 (35.8)    | M (52.8)  | WAR (58.5)                             | urine (56.6)               |
| <i>Morganella morganii</i> (5)                | 60-69 (60.0)  | F (60.0)  | WAR (100.0)                            | lung (60.0)                |
| <i>Proteus mirabilis</i> (5)                  | 20-49 (40.0)  | M (60.0)  | WAR (100.0)                            | lung (40.0)<br>skin (40.0) |
| <i>Proteus vulgaris</i> (1)                   | 20-49 (100.0) | F (100.0) | WAR (100.0)                            | lung (100.0)               |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (20)            | >70 (50.0)    | M (70.0)  | WAR (80.0)                             | lung (45.0)                |
| <i>Providencia rettgeri</i> (4)               | 20-49 (75.0)  | F (75.0)  | WAR (65.0)                             | urine (75.0)               |
| <i>Serratia marcescens</i> (5)                | 20-49 (40.0)  | M (80.0)  | WAR (50.0)                             | lung (60.0)                |
| <i>Shigella flexneri</i> (1)                  | >70 (100.0)   | F (100.0) | WAR (100.0)                            | urine (100.0)              |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (4)       | >70 (50.0)    | M (100.0) | WAR (100.0)                            | urine (75.0)               |
| <i>Enterococcus faecium</i> (6)               | >70 (50.1)    | F (83.3)  | ICU (66.7)                             | urine (66.7)               |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (22)             | 50-59 (27.0)  | M (54.5)  | WAR (63.6)                             | skin (36.4)                |
| <i>Staphylococcus coagulase negative</i> (16) | >70 (56.7)    | M (87.5)  | ICU (62.5)                             | blood (56.3)               |
| <i>Staphylococcus hominis</i> (6)             | 0-2 (50.1)    | NB (50.0) | ICU (33.3)<br>WAR (33.3)<br>NIC (33.3) | blood (66.7)               |
| <i>Staphylococcus haemolyticus</i> (8)        | 0-2 (50.0)    | NB (50.0) | ICU (50.0)<br>WAR (50.0)               | blood (100.0)              |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> (7)         | 0-2 (57.2)    | NB (28.6) | ICU (42.9)<br>WAR (42.9)               | blood (100.0)              |
| <i>Streptococcus</i> sp. (1)                  | 60-69 (100.0) | F (100.0) | WAR (100.0)                            | blood (100.0)              |

M: male; F: female; NB: newborn; OPT: outpatient; WAR: ward; ICU: Intensive Care Unit; NIC: Neonatal Intensive Care Unit.

Table 2. Rates of resistance and sensitivity of multi-resistant bacteria to antibiotic classes tested for Gram-negative bacilli and Gram-positive cocci found in two hospitals in Pelotas RS Brazil, 2018-2019

| Classes of Antibiotics         | Gram-negative bacilli |      | Gram-positive cocci |       |
|--------------------------------|-----------------------|------|---------------------|-------|
|                                | R                     | S    | R                   | S     |
|                                | %                     | %    | %                   | %     |
| AMINOGLYCOSIDES                | 32.9                  | 61.9 | 28.9                | 60.5  |
| CARBAPENEMS                    | 46.0                  | 51.1 |                     |       |
| CEFALOSPORINE                  | 75.7                  | 21.0 | 25.0                | 54.2  |
| FUSIDANAS                      |                       |      | 0                   | 100.0 |
| GLYCYLCTCLINES                 | 16.8                  | 64.0 | 0                   | 100.0 |
| GLUCOPEPTIDES                  |                       |      | 16.5                | 80.0  |
| INHIBITORS $\beta$ -LACTAMASES | 67.4                  | 22.0 |                     |       |
| LINCOSAMINES                   |                       |      | 90.3                | 9.7   |
| LIPOPEPTIDES                   |                       |      | 0                   | 100.0 |
| MACROLIDES                     |                       |      | 95.4                | 4.7   |
| NITROFURANS                    | 53.8                  | 44.1 | 0                   | 33.3  |
| OXALIDINONES                   |                       |      | 22.0                | 78.0  |
| PENICILLIN                     | 84.8                  | 14.9 | 77.4                | 22.6  |
| POLIPEPTIDES                   | 18.7                  | 81.3 |                     |       |
| QUINOLONES                     | 77.5                  | 20.6 | 74.5                | 19.1  |
| RIFAMPICINES                   |                       |      | 31.1                | 65.6  |
| TETRACYCLINES                  |                       |      | 12.5                | 87.5  |

R: resistant; S: sensitive



Table 3. Distribution of the epidemiological profile of the classes of antibiotics that presented the greatest bacterial resistance from two hospitals in the city of Pelotas RS BR, 2018-2019

| Classes of Antibiotics | Gram-negative bacilli |         |                 |               |
|------------------------|-----------------------|---------|-----------------|---------------|
|                        | Age group             | Gender  | Hospital origin | Sample source |
|                        | (%)                   | (%)     | (%)             | (%)           |
| Penicillins            | >70-31.8%             | M-53.5% | WAR-58.1%       | Urine-52.5%   |
| Quinolones             | >70-34.5%             | M-60.5% | WAR-43.9%       | Urine-52.9%   |
| Cephalosporins         | >70-33.5%             | M-55.2% | WAR-58.1%       | Urine-50.5%   |
|                        | Gram-positive cocci   |         |                 |               |
|                        | Age group             | Sex     | Hospital origin | Sample source |
|                        | (%)                   | (%)     | (%)             | (%)           |
| Penicillins            | >70-34.5%             | M-51.5% | WAR-43.9%       | Blood-56.1%   |
| Macrolides             | >70-24.6%             | M-49.2% | WAR -45.9%      | Blood-57.4%   |
| Lincosamines           | >70-23.2%             | M-53.6% | WAR -48.2%      | Blood-58.9%   |

M: male; WAR: ward

**Manuscrito 2 – 3,4 dihydropyrimidin-2-(1h)-ones analogues against multiresistant bacterial**

Autores:

Marisa Castro Jara, Allison Carlos Assunção Silva, Adriana Fernandes da Silva, Carolina Lambrecht Gonçalves, Luciano Sisconetto Borja, Marina Ritter, Pedro Rassier dos Santos, Cláudio Martins Pereira de Pereira, Patrícia da Silva Nascente

Publicação:

Manuscrito a ser submetido para a revista *Microbiology*, com fator de impacto 0,8, de acordo com as normas da publicação disponíveis neste *link*:

<https://www.springer.com/life+sciences/microbiology/journal/11021>

## EXPERIMENTAL ARTICLES

**3,4 dihydropyrimidin-2-(1h)-ones analogues against multiresistant bacterial**

M. C. Jara<sup>a, b, 1</sup>, A. C. Assunção-Silva<sup>c</sup>, M. Ritter<sup>c</sup>, A. F. da Silva<sup>d</sup>, C. L. Gonalves<sup>b</sup>, P. R. dos Santos<sup>b</sup>, L. S. Borja<sup>c</sup>, C. M. P. de Pereira<sup>c</sup>, P. da S. Nascente<sup>a, b</sup>.

<sup>a</sup> Postgraduate Program in Biochemistry and Bioprospecting, Federal University of Pelotas.

<sup>b</sup>Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Brasil.

<sup>c</sup>Laboratório de Lipidômica e Bio-orgânica (LLipBio), Universidade Federal de Pelotas, Brasil

<sup>d</sup>Laboratório de Cultivo Celular e de Biologia Molecular, Universidade Federal de Pelotas, Brasil.

<sup>1</sup>E-mail: marisajara@terra.com.br

**Abstract** — The increase in bacterial resistance to antimicrobials has led to high morbidity and mortality rates, setting a major public health problem, which the discovery of novel antimicrobials is a priority need. The dihydropyrimidinones (DHPM's) are nitrogenous compounds that present wide pharmacological activity described in the literature. The objective of this study was to evaluate the antibacterial activity of three synthetic DHPM's analogues against multiresistant bacterial isolates from hospital clinic. The biological samples was identified as gram-negative bacilli: *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* and gram-positive cocci: *Enterococcus faecium* and *Staphylococcus aureus*, all microorganisms are resistant to at least three classes of antibiotics. The antibacterial activity of the compounds was checked *in vitro* by the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) by the broth microdilution method (CLSI, 2012). The cytotoxicity of the compounds was evaluated in mouse fibroblasts of the 3T3 cell line. Synthetic compounds showed bactericidal in Gram-positive cocci with MIC of 0.16-80 µg/mL, bacteriostatic activity in Gram-negative bacilli with MIC of 23.2-80 µg/mL and were not cytotoxic at the highest concentration tested (80 µg/mL). The *E. faecium* bacteria shown the best MIC.

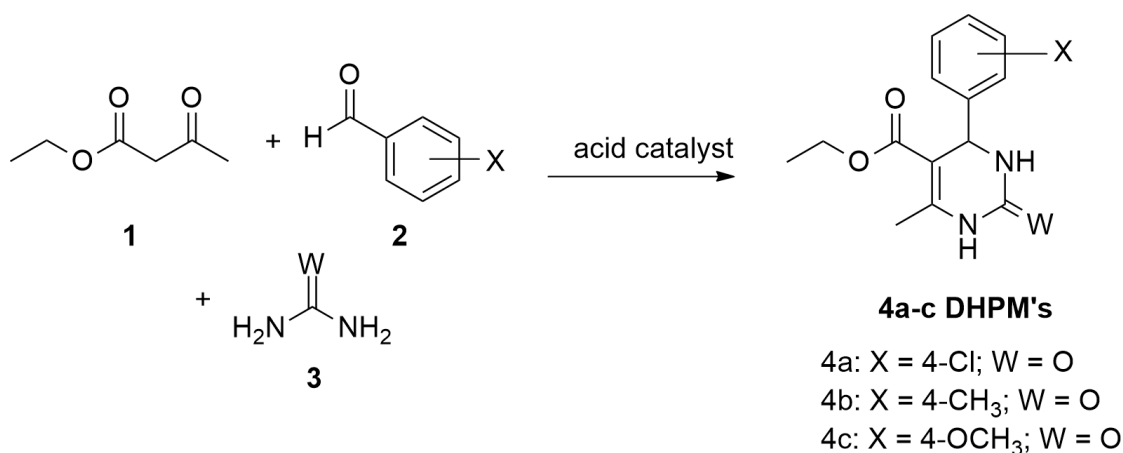
**Keyword:** Cytotoxicity, Antibacterial activity, Hospital Infection, DHPM, Biginelli compounds.

Bacterial multidrug is a serious and rapidly growing threat worldwide leading to high morbidity and mortality rates (Esposito and Simone 2017; Tegos and Hamblin 2014). Combating the advance of bacterial resistance to current antimicrobials should be a global priority, and everyone's responsibility. It is estimated that in 2050 antimicrobial resistance will become one of the leading causes of death (Leung et al. 2011; O'Neill 2016). It is crucial that the discovery of new antimicrobial be explored as important factor for solving the problematic of bacterial resistance (Tacconelli et al. 2018). Thus, has increased the scientific interest in the of bioactive nitrogen-containing heterocyclic such as 3,4-dihydropyrimidin-2 (1H)-one (DHPM's), theses compound were synthesized for the first time synthesized by the Italian chemist Pietro Biginelli in 1893 (Godoi et al. 2005; Mansouri et al. 2012; Venugopala et al. 2016). There are reports of several pharmacological activities in the literature for analogues and derivatives of DHPM's, such as: antitumor, antiviral, anti-inflammatory, antidepressant and calcium channel modulators (Fathima, Nagarajaiah, and Shahina 2013; Kappe 2000), antimalarial and anticancer (Ramachandran, Arumugasamy, and Singh 2016), as well as antioxidant, antibacterial (Laskowska et al. 2018; Stefani et al. 2006; Vasconcelos et al. 2012), insecticide and larvicide (Venugopala et al. 2016). This present study aimed to evaluate *in vitro* the antimicrobial activity of three analogues from DHPM's against multiple drug resistant isolates from hospital patients.

## MATERIALS AND METHODS

**General Procedure for the Synthesis of Compounds (4a-c).** The dihydropyrimidinones were obtained in the laboratory of Lipidomics and Bio-organic of the Federal University of Pelotas, RS – Brazil. The synthesis of desired compounds was realized mixing ethyl acetoacetate (**1**) (5 mmol), the appropriate aldehyde (**2a-c**) (5 mmol), urea (**3**) (8 mmol), and citric acid (5 mmol) in 10 mL of absolute ethanol. The mixture was stirred at reflux for 4 h, according to Alana *et al.* (2012), and the progress of reaction monitored by thin layer chromatography (TLC) and gas chromatography (GC). The organic phase was extracted with ethyl acetate (2 × 10 mL), washed with cold water (2 × 20 mL), dried with magnesium sulfate and the solvent removed under reduced pressure. The product obtained was purified by recrystallization with hexane and ethanol.

**Figure 1.** Biginelli reaction and formation of the compounds of interest.



The chemical characterization of the compounds was performed by melting point, infrared and gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) in Shimadzu equipment; model GC-MS-QP 2010SE.

**Multidrug-resistant bacterial isolates.** Three previously identified isolates of each bacterial species were evaluated: seven Gram-negative bacilli (BGN): *A. baumannii*, *E. coli*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *M. morgannii*, *P. aeruginosa*, *S. marcescens* and two Gram-positive cocci (CGP): *E. faecium* and *S. aureus*, which showed resistance to at least three classes of antibiotics.

The bacteria were donated by two hospitals in the city of Pelotas/Brazil (here named as Hospital A and B), it was previously identified when the species had their resistance profiles determined in each hospital, VITEK 2 - Biomerieux (hospital A), BD PHOENIX (Hospital B) systems. This study was approved by the Research Ethics Committees (CEP) under No. 2,961,379, 2,985,372 and by the National Ethics Committee on Research (CONEP) under No. 2,880,831 (Approval Platform Brazil).

**Antimicrobial activity.** The antimicrobial activity of the compounds was determined by the in broth Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) assay.

**Minimum Inhibitory Concentration (MIC).** Three DHPM's analogs were synthesized and tested *in vitro* in the Department of Microbiology and Parasitology, Institute of Biology of the Federal University of Pelotas, RS – Brazil. The MIC assay was determined according to the guidelines of document M07-A9, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2006). The concentration 1.6 mg/mL, obtained by weighing 4800 mg of the DHPM's diluted in dimethylsulfoxide P.A. (DMSO); and then diluted 1:10 in Müller-Hinton broth (MHB). In 96-well sterile microplates, prefilled with 100µL MHB, 100 µL of the test compound was added to the second column; followed by ten serial microdilutions (80 to 0.16 µg/mL) from column two to eleventh column, yielding a final volume in each 100 µL microwell. Was used as negative control the first column (MHB alone) and in the last column, as a positive control, MHB added to the inoculum containing the microorganism of interest. Subsequently, 5 µL of the inoculum was added from the second column to the last. Then the plates were incubated at 37°C in an oven for 24h. After this step the MIC was evaluated by colorimetric method with addition of 40 µL/well of the dye of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 0.015% and taken to the oven at 37°C for 30 minutes. The visual reading was performed through the presence or absence of pink staining, which identifies, respectively, bacteria metabolically active or not, against the presence of the compound. The assays for each isolate were performed in duplicate and with three replicates.

**Minimum Bactericidal Concentration (MBC).** After reading the MIC, a test was performed to verify the MBC (Minimum Bactericidal Concentration), through the plating in Brain Heart Infusion (BHI). An aliquot of 5 µL of the well corresponding to MIC and the next well was collected. After plating in BHI, the plate was incubated at 37 °C in a greenhouse for 24 hours to determine whether the concentrations were bactericidal or bacteriostatic.

**Cytotoxicity Assay.** The cytotoxicity assay was performed in the Cell Biology and Tissue Center (NCT-BIO) Laboratory of the Faculty of Dentistry of the Federal University of Pelotas-RS/Brazil. The cell viability assay was performed according to ISO 10993-5:2009 (ISO, 2009). Mouse fibroblasts of the 3T3 immortalized cell line ( $2 \times 10^4$ /well) were cultured in Dulbeccos's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum

(FBS) 2% L-glutamine, penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 mg/mL). Cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) was used to assess cell metabolic function by mitochondrial dehydrogenase activity.

The compounds were solubilized in DMSO and added to the DMEM medium, so that we obtained the concentration in the well of 80 µg/mL, 20 µg/mL and 5 µg/mL solubilized in DMSO 1.6%.

For evaluation of cell viability of the different DHPM's analogs, the compound diluted in 200 µL of DMEM, were placed in a well of a 96-well plates containing mouse fibroblasts of the 3T3 immortalized cell line ( $2 \times 10^4$ /well). As a control, a group containing only fibroblast cells in DMEM was used. The plates were incubated for 24h in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. After incubation, DMEM was removed and an MTT solution was placed in each well. After 4 h of incubation at 37°C in darkness the blue formazan precipitate was extracted from the mitochondria using 200 µL/well of dimethyl sulfoxide (DMSO) on a shaker for 5 minutes at 150 rpm. The absorption was determined using a spectrophotometer at a wavelength of 540 nm.

**Statistical analysis.** One-way ANOVA was used to evaluate the difference between the treated groups. To confirm the significance of the differences between the concentrations of the compounds tested in relation to the control group (a group containing only fibroblast cells in DMEM), the Tukey post hoc test was used. The differences that presented  $p < 0.05$  were considered statistically significant.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Chemical Data.** Ethyl 4-(4-chlorophenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (**4a**). Yield 90%. Melting Point 215°C; literature: 215°C (Pura et al. 2009) ; GC-MS m/z, (%), observed: 295.05 [M+1] (2.48%), 294.00 (14.65 %), 265.00 (68.48 %), 221.00 (43.70 %), 183.10 (100.00 %), 155.10 (53.68 %), 137.05 (45.35 %), 42.10 (43.11 %). C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [M]<sup>+</sup> requires: 294.00

Ethyl 6-methyl-2-oxo-4-(p-tolyl)-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (**4b**). Yield 75%. Melting Point 216°C; literature: 216-217 °C (Debaché et al. 2008) GC-MS m/z, (%), observed: 274.10 (16.08 %), 245.10 (70.02 %), 201.10 (53.35 %), 183.10 (100.00 %), 155.05 (51.91 %), 137.05 (42.42 %), 91.05 (26.01 %), 42.05 (33.05 %). C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [M]<sup>+</sup> requires: 274,13.

Ethyl 4-(4-methoxyphenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (**4c**). Yield 91%. Melting Point 205 °C; literature: 204-205 °C (Ranjith, Srinivasan, and Vijayan 2010); GC-MS m/z, (%), observed: 290.10 (20.72 %), 261.05 (100.00 %), 217.10 (69.51 %), 183.10 (55.24 %), 155.05 (39.75 %), 137.10 (36.14 %), 42.05 (30.29 %). C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> [M]<sup>+</sup> requires: 290.13

**Antimicrobial activity of synthetic compounds.** All DHPM analogues tested showed bactericidal activity in the CGP at concentrations that varied 0.16 to 80 µg/mL, for BGN only bacteriostatic activity was observed at concentrations of 23.3 to 80 µg/mL. The DHPMs demonstrated inhibitory potential against all bacterial species tested, inhibiting the growth of at least one isolate of each type.

The CIM was in the range of 0.16 to 80 µg/mL, with the lowest values referring to CGP reaching 0.16 µg/mL and reaching lower inhibitory activities for all multiresistant species of BGN with MIC in from 23.2 to 80 µg/mL.

The MICs observed according to each bacterial species are described in Table 1.

| Bacterial Species    | Mean MIC of Compounds (µg / mL) |       |       |       |       |       |       |       |       |
|----------------------|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                      | 4a                              |       |       | 4b    |       |       | 4c    |       |       |
|                      | N° bacterial isolates           |       |       |       |       |       |       |       |       |
|                      | 1                               | 2     | 3     | 1     | 2     | 3     | 1     | 2     | 3     |
| <i>A. baumannii</i>  | 64.00                           | 60.00 | 50.00 | 40.00 | 40.00 | 80.00 | 70.00 | 66.70 | 60.00 |
| <i>E. coli</i>       | 60.00                           | 80.00 | -     | 80.00 | -     | -     | 66.70 | -     | -     |
| <i>E. cloacae</i>    | 80.00                           | 80.00 | 60.00 | 80.00 | 80.00 | 52.50 | 66.60 | 80.00 | -     |
| <i>K. pneumoniae</i> | 70.00                           | 72.80 | 80.00 | 80.00 | 60.00 | 80.00 | 60.00 | 80.00 | 80.00 |
| <i>M. morgannii</i>  | 60.0                            | 80.00 | 66.60 | 80.00 | 80.00 | 60.00 | 56.00 | 70.00 | 23.35 |
| <i>P. aeruginosa</i> | 80.00                           | 60.00 | 80.00 | 60.00 | 60.00 | 40.00 | 80.00 | 53.30 | 60.0  |
| <i>S. marcescens</i> | 60.00                           | -     | -     | 53.30 | 70.00 | 60.00 | 30.00 | -     | 73.30 |
| <i>E. faecium</i>    | 80.00                           | 40.00 | 20.00 | 70.00 | 0.16  | 0.16  | 60.00 | 80.00 | 0.16  |
| <i>S. aureus</i>     | -                               | 0.16  | -     | -     | 0.16  | -     | -     | 0.16  | -     |

Table 1. Mean of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of DHP's against multiresistant bacteria of hospital origin.

According to the results, we propose a relationship structure-activity. The bacteria *A. baumannii*, *M. morgannii* and *E. faecium* were more sensitive to compound **4b** with a group electron withdraw bonding to aromatic ring. Yet, the compound **4c**, with an electron donator group  $\text{OCH}_3$ , was more effective against *M. morgannii* and *E. faecium*. While *A. baumannii* and *P. aeruginosa* were also sensitive, with a different donator group, Cl. In general, *E. faecium* was inhibited by three compounds, while *E. coli* showed the highest resistance on the tested DHPs. *S. aureus* (isolates 1 and 3) presented bacterial resistance against the three tested DHPM compounds, contrasting with the highest MIC sensitivity of 0.16 in isolate 2 of all the compounds, suggesting further research with this multidrug resistant bacterium.

The substitution at the C-4 position of the aromatic aldehyde of the DHPM's series (4-methoxyphenyl, 4-chlorophenyl and p-toluy), altered the antibacterial potential, since the hospital isolates had different profiles of susceptibility at different concentrations tested, which shows that these compounds present promising antibacterial potential against multiresistant strains.

In the literature there are few reports of antibacterial activity in relation to the DHPM's analogues described here, and no study was found in multiresistant bacteria from hospital. Chitra and Devanathan (2012) describe analogues of DHPM's with chlorine, nitrogen and fluorine at the 4-position of the aromatic aldehyde. These compounds showed *in vitro* antibacterial activity against *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* and *Salmonella typhi*.

Attri et al. (2017) and (Medyouni et al. 2016) observed promising antibacterial activity of two of the same compounds here described (4a and 4b) in standard bacterial strains: *E. coli* (MTCC 443), *S. aureus* (MTCC 3160), *P. aeruginosa* (MTCC 2581), *K. pneumoniae* (MTCC 7028), purchased from the Institute's culture bank of Microbial Technology. This study reports that compound 4a showed good inhibitory activity for all strains tested, probably due to the presence of a halogen atom in the compound which increases the antibacterial activity; while 4b compound had no antibacterial activity in *E. coli* and *K. pneumoniae* strains.

In Attri's et al (2017) study, compound 4a recorded results for *E. coli* between 31.250 to 15.625 ppm corresponding 31.250 to 15.625  $\mu\text{g}/\text{mL}$  compared to the  $\mu\text{g}/\text{mL}$  unit used in our experiments; with good activity, while in our study we had a range of 60 to 80 ppm ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

Regarding *S. aureus*, the authors had moderate activity with MICs of 62.5-125.0 ppm in compounds 4a and 4b, while MIC for 0.155 ppm ( $\mu\text{g/mL}$ ) with excellent antibacterial activity. In *P. aeruginosa*, compounds 4a and 4b showed good antibacterial activity with MIC value in the range of 15.625 to 31.250 ppm ( $\mu\text{g/mL}$ ); while our tests on compound 4b showed 40 to 60 ppm ( $\mu\text{g/mL}$ ), and compound 4a resulted in 60 to 80 ppm ( $\mu\text{g/mL}$ ), showing that in Attri's *et al* (2017) studies it was most promising with good activity in relation to our study that obtained moderate activity. Compound 4a, Attri *et al* (2017) showed activity in the *K. pneumoniae* bacterium only with MIC 31.25-62.50 ppm ( $\mu\text{g/mL}$ ), considered moderate and in our study an MIC between 70 to 80 ppm ( $\mu\text{g/mL}$ ), very close to the antibacterial activity found in this study.

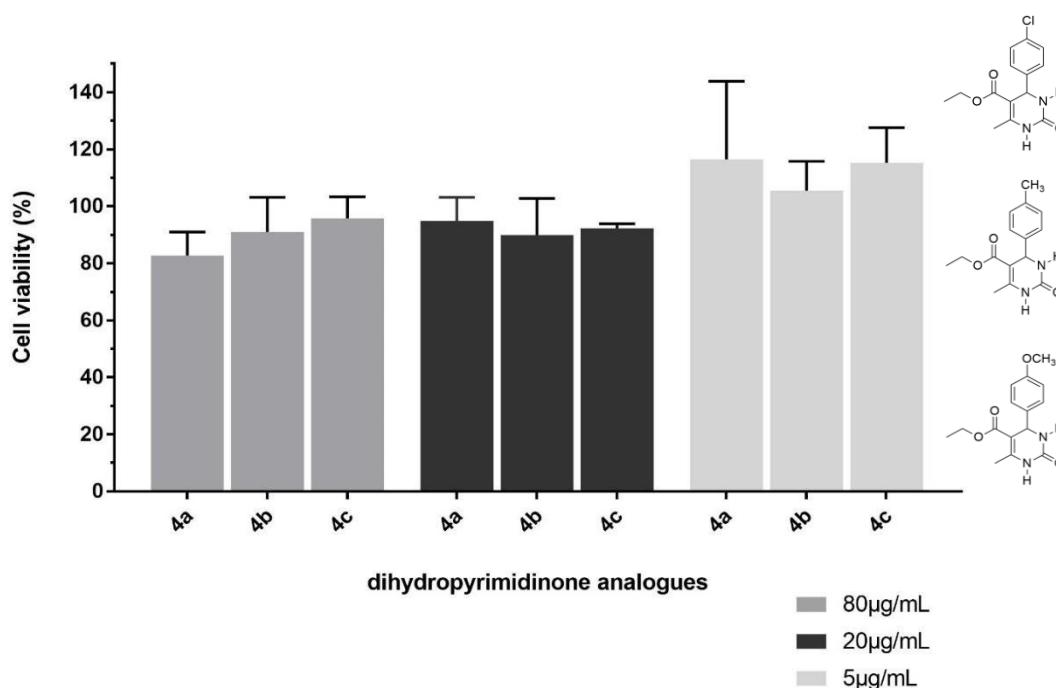
Another research described by Medyouni *et al.* (2016) evaluated *in vitro* the activity of compound 4b by plaque diffusion method against Gram-positive bacterial strains (*Micrococcus luteus* LB 14110, *S. aureus* ATCC 6538, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 and *Agrobacterium tumefaciens*), Gram-negative bacteria (*Salmonella Typhimurium* ATCC 14028 and *P. aeruginosa* ATCC 49189). The authors observed MICs of 2.5 mg/mL (2500  $\mu\text{g/mL}$ ) and 0.016 mg/mL (0.16  $\mu\text{g/mL}$ ) for *S. aureus* and *P. aeruginosa*, but it was not possible to compare results with our experimental application by difference technique used by the authors.

In the context of the emerging need to discover new products with antifungal and antibacterial properties, the development of DHPM's derivatives brings an interesting alternative and perspective on the efficacy of drugs as future antimicrobial agents. The results of *in vitro* antibacterial activity suggest that compounds A, B and C have potent *in vitro* antibacterial activity in multiresistant bacteria from hospital. In addition, the cytotoxicity study revealed that all compounds did not show significant cytotoxicity against mouse fibroblast cell lines at the higher concentration assessed, indicating the selectivity of their antimicrobial action. All three compounds showed antibacterial activity in both BGN and CGP.

Thus, it is necessary to invest in the continuity of the research to explore the antimicrobial potential of these compounds, as well as the elucidation of the mechanism of action attributed to them.

**Toxicity of the synthetic compounds.** The three compounds were found to be non-cytotoxic to the cell line and concentration tested (80  $\mu\text{g/mL}$ ), as shown in Figure 1. The three compounds presented cell viability above 80% in the three concentrations tested.





**Figure 2.** Cytotoxicity of dihydropyrimidinone analogs (4a, 4b and 4c) using MTT assay. The compounds were tested at concentrations  $\mu$  of 80  $\mu\text{g/mL}$ , 20  $\mu\text{g/mL}$  and 5  $\mu\text{g/mL}$  and incubated for 24h. The cell viability/proliferation using mouse fibroblasts of the 3T3 cell line (control = negative group representing cell viability 100%), showed no difference among the groups ( $p > 0.05$ ).

The results of the cytotoxicity test indicate that the synthetic compounds showed no significant difference for the three concentrations tested (5, 20 and 80  $\mu\text{g/mL}$ ), presenting cellular viability not different from that attributed to the control, without the presence of the tested compounds.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to UFPel, CAPES, FAPERGS and CNPq.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors have declared no conflict of interest.

## REFERENCES

- Attri, Pankaj et al. 2017. "Triethylammonium Acetate Ionic Liquid Assisted One-Pot Synthesis of Dihydropyrimidinones and Evaluation of Their Antioxidant and Antibacterial Activities." *Arabian Journal of Chemistry* 10(2): 206–14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.05.007>.
- Chitra, S., and D. Devanathan. 2012. "IN-VITRO MICROBIOLOGICAL EVALUATION OF 5-ETHOXYCARBONYL-4-ARYL-6-METHYL-3, 4- DIHYDROPYRIMIDIN-2(1H)-ONES." *International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences* 2(6): 56–58.
- CLSI. 2006. 23 M2a9 *Clinical and Laboratory Standards Institute*. <http://www.microbiolab-bg.com/CLSI.pdf>.
- Debache, Abdelmadjid et al. 2008. "A One-Pot Biginelli Synthesis of 3, 4-Dihydropyrimidin-2- (1 H) -Ones / Thiones Catalyzed by Triphenylphosphine as Lewis Base." *Tetrahedron Letters* 49(8): 6119–21.

- Esposito, Silvano, and Giuseppe De Simone. 2017. "Update on the Main MDR Pathogens: Prevalence and Treatment Options." *Le Infezioni in Medicina* 4: 301–10.
- Fathima, Nikhath, H Nagarajaiah, and Noor Shahina. 2013. "Methyl 5-(4-Acetoxyphenyl)-2-(2-Bromobenzylidene)-7-Methyl-3-Oxo-2,3-Di-Hydro-5H-1,3-Thiazolo[3,2-a]Pyrimidine-6-Carboxylate." *Acta Crystallographica Section* 6018(5).
- Godoi, Marla N et al. 2005. "SÍNTESE DO MONASTROL E NOVOS COMPOSTOS DE BIGINELLI PROMOVIDA POR  $\text{In}(\text{OTf})_3$ ." *Quim. Nova* 28(6): 1010–13.
- ISO - International Organization for Standardization. ISO 10993-5:2009 Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. 2009. *ISO.Pdf*.
- Kappe, C Oliver. 2000. "Review Biologically Active Dihydropyrimidones of the Biginelli-Type — a Literature Survey." *Eur. J. Med. Chem.* 35: 1043–52.
- Laskowska, Katarzyna Niemirowicz- et al. 2018. "Bactericidal and Immunomodulatory Properties of Magnetic Nanoparticles Functionalized by 1,4-Dihydropyridines." *International Journal of Nanomedicine* 13: 3411–24.
- Leung, Emily, Diana E Weil, Hiroki Nakatani, and Health Organization. 2011. "The WHO Policy Package to Combat Antimicrobial Resistance." *Bull World Health Organ* (89): 390–92.
- Mansouri, ArticlM., A. Movahedian, M. Rostami, and A. Fassihi. 2012. "Synthesis and Antioxidant Evaluation of 4-(Furan-2-Yl)-6-Methyl-2-Thioxo-1,2,3,4-Tetrahydropyrimidine-5-Carboxylate Esters." *Research in Pharmaceutical Sciences* 7(4): 257–64.
- Medyouni, Rawdha et al. 2016. "One-Pot Three-Component Biginelli-Type Reaction to Synthesize 3,4-Dihydropyrimidine-2-(1H)-Ones Catalyzed by Co Phthalocyanines: Synthesis, Characterization, Aggregation Behavior and Antibacterial Activity Rawdha." *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 167: 165–74.
- O'Neill, Jim. 2016. "Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations." *the Review on Antimicrobial Resistance* (May): 84. <https://amr-review.org>.
- Pura, Saurabh, Balbir Kaur, Anupama Parmar, and Harish Kumar. 2009. "Ultrasound promoted  $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$  catalyzed rapid synthesis of substituted 1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-2-ones & hantzsch 1,4-dihydropyridines in dry media Saurabh." *Heterocyclic Communications* 15(1): 51–56.
- Ramachandran, Vanitha, Karthiga Arumugasamy, and Sanjeev Kumar Singh. 2016. "Synthesis, Antibacterial Studies, and Molecular Modeling Studies of 3, 4-Dihydropyrimidinone Compounds." *J Chem Biol* 9(1): 31–40.
- Ranjith, Choorikkat, G. V. Srinivasan, and K. K. Vijayan. 2010. "Tributyl Borate Mediated Biginelli Reaction: A Facile Microwave-Assisted Green Synthetic Strategy toward Dihydropyrimidinones." *Bull. Chem. Soc. Jpn.* Vol. 83(3): 288–90.
- Stefani, Hélio A. et al. 2006. "Dihydropyrimidin-(2H)-Ones Obtained by Ultrasound Irradiation: A New Class of Potential Antioxidant Agents." *European Journal of Medicinal Chemistry* 41(4): 513–18.
- Tacconelli, Evelina et al. 2018. "Discovery, Research, and Development of New Antibiotics: The WHO Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria and Tuberculosis." *Lancet Infect Dis* 18(3): 318–27.
- Tegos, George P., and Michael R. Hamblin. 2014. "Disruptive Innovations: New Anti-Infectives in the Age of Resistance." *Curr Opin Pharmacol* 13(5): 1–7.
- Vasconcelos, Alana De et al. 2012. "Antioxidant Capacity and Environmentally Friendly Synthesis of Dihydropyrimidin- (2 H) -Ones Promoted by Naturally Occurring Organic Acids." *J BIOCHEM MOLECULAR TOXICOLOGY* 26(4): 155–61.
- Venugopala, Katharigatta N et al. 2016. "Design, Synthesis, and Characterization of (1-(4-

Aryl)- 1H-1,2,3-Triazol-4-Yl)Methyl, Substituted Phenyl- 6-Methyl-2-Oxo-1,2,3,4-Tetrahydropyrimidine-5- Carboxylates against Mycobacterium Tuberculosis.” *Drug Design, Development and Therapy* (10): 2681–90.

## 5 Conclusão

O perfil epidemiológico das IRAS em dois hospitais de Pelotas, RS, realizado de outubro/2018 à janeiro/2019 representou estatisticamente o total da população do município pelo cálculo amostral de 286 isolados bacterianos.

A bactéria multirresistente prevalente nos hospitais estudados foi a *K. pneumoniae* (N=51;17,8%), seguida da *A. baumannii* (N=46;16,4%) e *E. coli* (N=44;15,0%).

O estudo indicou maior resistência bacteriana em pacientes do sexo masculino e com idade superior a 60 anos, internados em enfermarias, e o sítio de infecção predominante foi o trato urinário.

O trato urinário foi o sítio de infecção predominante (40,6%), e as principais bactérias encontradas nas amostras de urina foram *E. Coli* (85,7%), em pacientes do sexo masculino (63,6%), na faixa etária entre 20-49 (31,8%) anos, internados em enfermarias (68,2%) e *K. pneumoniae* (56,6%) em pacientes do sexo masculino (52,8%), acima de 70 anos (35,8%), internados em enfermarias (58,5%).

As bactérias prevalentes detectadas entre os BGNs foram *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, as quais demonstraram resistência aumentada especialmente frente às seguintes classes de antibióticos: penicilina (84,8%), quinolonas (77,5%) e cefalosporina (75,7%). Entre CGP os que apresentaram maior resistência foram *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase negativa* e *Staphylococcus haemolyticus*, apresentando resistência aos macrolídeos (95,4%), lincosaminas (90,3%), e os penicilinas (77,4%).

O estudo apontou que os BGN foram mais resistentes às classes das penicilinas, quinolonas e cefalosporina, predominaram especialmente no trato urinário, entre pacientes acima dos 70 anos, do sexo masculino, internados em enfermarias. Por outro lado, os CGP apresentaram maior resistência às classes das penicilinas, lincosaminas e macrolídeos, predominando nas infecções sanguíneas, entre homens acima de 70 anos, internados em enfermarias. O estudo indicou que as IRAs constituem um grave problema de saúde pública no âmbito de sua realização. Apontando para a necessidade de novas pesquisas e o desenvolvimento de estratégias de prevenção e combate em nível local.

Os três compostos de DHPM testados apresentaram atividade terapêutica *in vitro* frente a bactérias multirresistentes de origem clínica hospitalar tanto nos BGN como nos CGP. A bactéria *E. faecium* apresentou a melhor CIM de 0,16 µg/mL enquanto a *Escherichia coli* foi a mais resistente em dois dos isolados testados. O *S. aureus* (isolado 1 e 3) apresentaram resistência bacteriana frente aos três compostos de DHPM testados contrapondo com a maior sensibilidade com MIC de 0,16 no isolado 2 de todos os compostos, sugerindo maiores pesquisas com essa bactéria multirresistente. Os compostos de DHPM tiveram ação bactericida em todos os CGP e bacteriostática em todos os BGN testados, não demonstrando citotoxicidade nos três compostos de DHPM testados *in vitro* com fibroblastos de camundongo da linha celular 3T3 imortalizada nas concentrações de 5, 20 e 80µg/mL, apresentando viabilidade celular acima de 80% nas três concentrações testadas.

O estudo instiga o desenvolvimento de pesquisas visando melhor explorar a potencialidade terapêutica desses compostos.

## Referências

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Agência nacional de vigilância sanitária**. Legislação e criação de um programa de prevenção e controle de infecção hospitalar (Infecção Relacionada À Assistência À Saúde - IRAS). Brasília: Anvisa, 2004a.

\_\_\_\_\_. Anvisa intensifica controle de infecção em serviços de saúde. **Revista de Saúde Pública**, v. 38, n. 3, p. 475-478, 2004b.

\_\_\_\_\_. **Indicadores nacionais de infecções relacionadas à assistência à saúde**. Brasília: Anvisa, 2010. 17 p.

\_\_\_\_\_. **Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde**. Boletim Informativo, n. 14. Brasília: Anvisa, 2016.

\_\_\_\_\_. **Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 17: Avaliação dos indicadores nacionais das infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) e resistência microbiana do ano de 2017**. Brasília: Anvisa, 2017a.

\_\_\_\_\_. **Plano nacional para a prevenção e o controle da resistência microbiana nos serviços de saúde**. Brasília: Anvisa, 2017b, p. 12-13.

\_\_\_\_\_. Resolução-Anvisa/dc nº 48, de 2 de junho de 2000. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 6 jul. 2000. Seção 1, p. 22-4 – Republicada.

\_\_\_\_\_. **Programa nacional de prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde (2013–2015)**. 2013. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33852/272166/Programa+Nacional+de+Preven%C3%A7%C3%A3o+e+Controle+de+Infec%C3%A7%C3%B5es+Relacionadas+%C3%A0+Assist%C3%A2ncia+%C3%A0+Sa%C3%BAde+%282013-2015%29/d1d0601f-004c-40e7-aaa5-0af7b32ac22a>. Acesso em: 16 maio 2019.

ALLEGIANZI, B.; BAGHERI NEJAD, S.; COMBESCURE, C.; GRAAFMANS, W.; ATTAR, H.; DONALDSON, L., *et al.* Burden of endemic health-care-associated infection in developing countries: systematic review and metaanalysis. **Lancet**, v. 377, n. 9761, p. 228-241, 2011. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61458-4 [PubMed]

ANDRADE, D.; LEOPOLDO, V.C.; HAAS, V.J. Ocorrência de bactérias multirresistentes em um centro de Terapia Intensiva de Hospital brasileiro de emergências. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 18, n. 1, p. 27-33, 2006.

ANGELIS, G.V. *et al.* Incidence and antimicrobial resistance trends in bloodstream infections caused by ESKAPE and Escherichia coli at a large teaching hospital in Rome, a 9-year analysis (2007–2015). **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 37, p. 1627-1636, 2018.

ANGHINONI, T.H.; CONTRIN, L.M.; BECCARIA, L.M.; FRUTUOSO, I.S.; RODRIGUES, A.M.S.; WERNEK, A.L. Adherence to the protocol for the prevention of

urinary tract infection. **Journal of Nursing UFPE on line** [S.l.], v. 12, n. 10, p. 2675-2682, 2018.

ARGUDÍN, M.A.; DEPLANO, A.; MEGHRAOUI, A.; DODÉMONT, M.; HEINRICHS, A.; DENIS, O.; NONHOFF, C.; ROISI, S. Bacteria from animals as a pool of antimicrobial resistance genes. **Antibiotics**, v. 6, n. 2, p. 12, 2017.

ASHRAFI, M.; NOVAK-FRAZER, L.; BATES, M.; BAGUNEID, M.; ALONSO-RASGADO, T.; XIA, G.; RAUTEMAA-RICHARDSON, R.; BAYAT, A. Validation of biofilm formation on human skin wound models and demonstration of clinically translatable bacteria-specific volatile signatures. **Scientific Reports**, v. 8, art. n. 9431, 2018.

BASSETTI, M.; RIGHI, E. Development of novel antibacterial drugs to combat *multiple resistant organisms*. **Langenbeck's Archives of Surgery**, v. 400, p. 153–165, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria n. 196, de 24 de junho de 1983**. Dispõe sobre instruções para o controle e prevenção das infecções hospitalares. Diário Oficial da União, Brasília, 25 jun. 1983. Seção 1, p. 1.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. **Portaria n.º 930 de 27 de agosto de 1992**. Dispõe sobre normas e instruções para o controle das infecções hospitalares no país (revoga a Portaria 196/83). Diário Oficial da União, Brasília, 4 de setembro de 1992. Seção I, p. 12279-12282.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. **Portaria n. 2.616, de 12 de maio de 1998**. Dispõe sobre diretrizes e normas para a prevenção e o controle das infecções hospitalares [Internet]. Brasília; 1998. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/1998/prt2616\\_12\\_05\\_1998.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/1998/prt2616_12_05_1998.html) 9. Acesso em: 27 maio 2019.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). **RDC n.º 48, de 2 de junho de 2000**. Aprova o Roteiro de Inspeção do Programa de Controle de Infecção Hospitalar [Internet]. Brasília; 2000. Disponível em: [http://www.saude.mg.gov.br/images/documentos/Res\\_048.pdf](http://www.saude.mg.gov.br/images/documentos/Res_048.pdf). Acesso em: 27 maio 2019.

\_\_\_\_\_. Presidência da República. **Lei nº 9.431, de 6 de janeiro de 1997**. Dispõe sobre a obrigatoriedade da manutenção de programa de controle de infecções hospitalares pelos hospitais do País. Diário Oficial da União - Seção 1 - 7/1/1997, Página 265 (Publicação Original)

BRINKAC, L.; VOORHIES, A.; GOMEZ, A.; NELSON, K.E. The Threat of Antimicrobial Resistance on the Human Microbiome. **Microbial Ecology**, v. 74, n. 4, p. 1001-1008, 2017.

BROGAN, D.M; MOSSIALOS, E. Incentives for new antibiotics: the Options Market for Antibiotics (OMA) model. **Globalization and Health**, v. 9, p. 58, 2013.

CAG, Y.; CASKURLU, H.; FAN, Y.; CAO, B.; VAHABOGLU, H. Resistance mechanisms. **Annals of Translational Medicine**, v. 4, n. 17, p. 326, 2016.

CHENG, C.C.; ROTH, B. 6 recent progress in the medicinal chemistry of 2,4-diaminopyrimidines. **Progress in Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 269–331, 1982.

CHITRA, S.; DEVANATHAN, D. In-vitro microbiological evaluation of 5-ethoxycarbonyl-4-aryl-6-methyl-3,4-dihydropyrimidin-2 (1h) -ones. **International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences**, v. 2, n. 6, p. 56-58, 2012.

CONCEIÇÃO, N.; OLIVEIRA, C.C.H.B.; SILVA, P.R.; ÁVILA, B.G.M.; OLIVEIRA, A.G. Trends in antimicrobial resistance among clinical isolates of enterococci in a Brazilian tertiary hospital: a 4-year study. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 2, p. 177-181, 2011.

DE FÁTIMA, Â.; BRAGA, T.C.; DA S. NETO, L.; TERRA, B.S.; OLIVEIRA, B.G.; DA SILVA, D.L.; et al. Uma mini-revisão sobre adutos biginelli com notáveis propriedades farmacológicas. **J. Adv. Res.**, v. 6, p. 363-673, 2015.

DE KRAKER, M.E.A.; STEWARDSON, A.J.; HARBARTH, S. Will 10 million people die a year due to antimicrobial resistance by 2050? **PLoS Medicine**, v. 13, n. 11, e1002184, 2016.

DEUTSCH, G. et al. Balneotherapy is a potential risk factor for *Pseudomonas aeruginosa* colonization. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, n. 1, p. 125-135, 2016.

DHONGADE, H.J.; DANSENA, H.; CHANDRAKAR, K.K. Pharmacological potentials of pyrimidine derivative: A review. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 8, n. 4, p. 171-177, 2015.

ELHOSSEINY, N.M.; ATTIA, A. S. *Acinetobacter*: an emerging pathogen with a versatile secretome. **Emerging Microbes & Infections**, v. 7, p. 33, 2018.

ERDEM, H.; INAN, A.; ALTINDIS, S.; CAREVIC, B.; ASKARIAN, M.; COTTLE, L., et al. Surveillance, control and management of infections in intensive care units in Southern Europe, Turkey and Iran—a prospective multicenter point prevalence study. **Journal of Infection**, v. 68, n. 2, p. 131–140, 2014.

ESPOSITO, S.; DE SIMONE, G. Update on the main MDR pathogens: prevalence and treatment options. **Le infezioni in medicina**, v. 25, n. 4, p. 301-310, 2017.

FATHIMA, N.; NAGARAJAIAH, H.; BEGUM, N.S. Methyl 5- (4-acet oxy phen yl) -2- (2-bromo benzyl idine) -7-methyl-3-oxo- 2,3- di hydro-5 H -1,3-thia zolo [3,2- a] pyrimidine-6-carboxyl up. **Minutes Crystallographica Section E: Structure Reports Online**, v. 69, n. Pt. 8, p. o1262, 2013.



FUTTERMAN, S. Enzymatic reduction of folic acid and dihydrofolic acid to tetrahydrofolic acid. **Journal of Biological Chemistry**, v. 228, n. 2, p. 1031–1038, 1957.

GODOI, M.N.; COSTENARO, H.S.; KRAMER, E.; MACHADO, P.S.; D'OCA, M. G.M.; RUSSOWSKY, D. Synthesis of monastrol and new compounds of Biginelli promoted by In (OTf) 3. **New Chemistry**, v. 28, paragraph 6, p. 1010-1013, 2005.

HAWSER, S.; LOCIURO, S.; ISLAM, K. Dihydrofolate reductase inhibitors as antibacterial agents. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, n. 7, p. 941–948, 2006.

HITCHINGS, G.H.; ELION, G.B.; VANDERWERFF, H.; FALCO, E.A. Pyrimidine derivatives as antagonists of pteroylglutamic acid. **Journal of Biological Chemistry**, v. 174, n. 2, p. 765–766, 1948.

HORNSEY, M.; WAREHAM, D.W. Effects of in vivo emergent tigecycline resistance on the pathogenic potential of *Acinetobacter baumannii*. **Scientific Reports**, v 2018, n. 8, p. 4234, 2018.

HUGHES, J.; ROBERTS, L.C.; COPPRIDGE, A.J. Sulfacytine: a new sulfonamide. double-blind comparison with sulfisoxazole in acute uncomplicated urinary tract infections. **Journal of Urology**, v. 114, n. 6, p. 912–914, 1975.

KAPPE, C.O. Biologically active dihydropyrimidones of the Biginelli- type - a literature survey. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 35, n. 12, p. 1043-1062, 2000.

KHAN, H.A.; AHMAD, A.; MEHBOOB, R. Nosocomial infections and their control strategies. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 7, p. 509-514, 2015.

KHAN, H.A.; BAIG, F.K.; MEHBOOB, R. Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 5, p. 478-482, 2017.

KOMPIS, I.; WICK, A. Synthese von 4-halogensubstituierten analogen von trimethoprim. **Helvetica Chimica Acta**, v. 60, n. 8, p. 3025–3034, 1977.

LIMA, M.F.P.; BORGES, M.A.; PARENTE, R.S.; JÚNIOR, R.C.V.; DE OLIVEIRA, M.E. *Staphylococcus aureus* e as infecções hospitalares. Revisão de Literatura. **Revista Uningá Review**, v. 21, n. 1, 2015.

LORENZONI, V.V.; RUBERT, F.C.; RAMPELOTTO, R.F.; HÖRNER R. Increased antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae* from a University Hospital in Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 5, p. 676-679, 2018.

MACINTYRE, C.R.; BUI, C.M. Pandemics, public health emergencies and antimicrobial resistance - putting the threat in an epidemiologic and risk analysis context. **Archives of Public Health**, v. 75, p. 54, 2017.

MAGILL, S.S.; EDWARDS, J.R.; BAMBERG, W.; BELDAVS, Z.G.; DUMYATI, G.; KAINER, M.A., *et al.* Multistate pointprevalence survey of health care-associated infections. **New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 13, p. 1198–1208, 2014.

MAGIORAKOS, A.P., *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**, v. 18, n. 3, p. 268-281, 2012.

MANSOURI, M.; MOVAHEDIAN, A.; ROSTAMI, M.; FASSIHI, A. Synthesis and antioxidant evaluation of 4- (furan-2-yl) -6-methyl-2-thioxo-1,2,3,4 - tetrahydropyrimidine-5-carboxylate esters. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 4, p. 257-264, 2012.

MUKERJI, S.; O'DEA, M.; BARTON, M.; KIRKWOOD, R.; LEE, T.; ABRAHAM, S. Development and transmission of antimicrobial resistance among Gram-negative bacteria in animals and their public health impact. **Essays In Biochemistry**, v. 61, n. 1, p. 23-35, 2017.

NEVES, P.R.; MAMIZUKA, E.M.; LEVY, C.E.; LINCOPAN, N. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 4, p. 409-420, 2011.

NIEMIROWICZ-LASKOWSKA, K., *et al.* Bactericidal and immunomodulatory properties of magnetic nanoparticles functionalized by 1,4-dihydropyridines. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 3411-3424, 2018.

OLIVARES, J.; BERNARDINI, A.; GARCIA-LEON, G.; CORONA, F.; B. SANCHEZ, M.; MARTINEZ, J.L. The intrinsic resistome of bacterial pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 103, 2013.

OLIVEIRA, I.L.; DE PAULA, M.A. Processos e estratégias de comunicação no contexto das organizações. In: OLIVEIRA, I.L.; LIMA, F. **Propostas conceituais para a comunicação no contexto organizacional**. São Caetano do Sul: Difusão, 2012.

OLIVER, A.; MULET, X.; LOPEZ-CAUSAPE, C.; JUAN, C. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. **Drug Resistance Updates**, v. 21-22, art. n. ° 555, p. 41-59, 2015.

O'NEILL, J. **Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations**. The Review on Antimicrobial Resistance. London, UK: Wellcome Trust; HM Government, 2014.

PADOVEZE, M.C.; FORTALEZA, C.M.C.B. Infecções relacionadas à assistência à saúde: desafios para a saúde pública no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 48, n. 6, p. 995-1001, 2014.

PELEG, A.Y.; HOOPER, D.C. Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria. **The New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 19, p. 1804-1813, 2010.

PENDLETON, J.N.; GORMAN, S.P.; GILMORE, B.F. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 11, n. 3, p. 297-308, 2013.

POTHIRAJ, C.; VELAN, A.S.; JOSEPH, J.; RAMAN, N. Método simples de Preparação e caracterização de novos antifúngicos Ativo Biginelli Tipo Compostos Heterocíclicos. **Mycobiology**, v. 36, n. 1, p. 66-69, 2008.

PRADE, S.S.; OLIVEIRA, S.T.; RODRIGUEZ, R.; NUNES, F.A.; NETTO, E.M.; PEREIRA, M. Estudo brasileiro da magnitude das infecções hospitalares em hospitais terciários. **Revista do Controle de Infecção Hospitalar**, v. 2, n. 2, p. 11-24, 1995.

RAMACHANDRAN, V.; ARUMUGASAMY, K.; SINGH, S.K.; EDAYADULLA, N.; RAMESH, P.; KAMARAJ, S.K. Synthesis, antibacterial studies, and molecular modeling studies of 3,4- dihydropyrimidinone compounds. **Journal of Chemical Biology**, v. 9, n. 1, p. 31-40, 2016.

REDDICK, J.J.; SAHA, S.; LEE, J.; MELNICK, J.S.; PERKINS, J.; BEGLEY, T.P. The mechanism of action of bacimethrin, a naturally occurring thiamin antimetabolite. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 11, n. 17, p. 2245–2248, 2001.

RIBEIRO, M.; CORTINA, M.A. As principais bactérias de importância clínica e os mecanismos de resistência no contexto das infecções relacionadas à assistência a saúde (IRAS). **Revista Científica UMC**, v. 1, n. 1, 2016.

RICE, L.B. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. **Journal of Infectious Diseases**, v. 197, p. 1079–1081, 2008.

RODLOFF, A.C.; DOWZICKY, M.J. Antimicrobial Susceptibility among European Gram-Negative and Gram-Positive Isolates Collected as Part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (2004-2014). **Chemotherapy**, v. 62, p. 1-11, 2017.

ROSSI, F.; GIRARDELLO, R.; CURY, A.P.; DI GIOIA, T.S.R.; ALMEIDA JR., J.N.; DUARTE, A.J.S. Emergence of colistin resistance in the largest university hospital complex of São Paulo, Brazil, over five years. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 98-101, 2017.

RUIZ, J.; GORDON, M.; VILLARREAL, E.; FRASQUET, J.; SÁNCHEZ, M.Á.; MARTÍN, M., *et al.* Influência da pressão do antibiótico na colonização por *Klebsiella pneumoniae* resistente a múltiplos medicamentos em pacientes críticos. **Resistência antimicrobiana e controle de infecção**, v. 8, p. 38, 2019. doi: 10.1186 / s13756-019-0484-8

SAMPAIO, C.P.S; DIAS, I.M.; FARIA, F.M; OLIVEIRA, M.V.M. Principais bactérias causadoras de infecção hospitalar. **EFDeportes.com**, v. 18, n. 182, 2013.

SANTAJIT, S.; INDRAWATTANA, N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. **BioMed Research Internacional**, v. 2016, n. 2016, p. 2475067, 2016.

SCHNEIDER, P.; HAWSER, S.; ISLAM, K. Iclaprim, a novel diaminopyrimidine with potent activity on trimethoprim sensitive and resistant bacteria. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, n. 23, p. 4217–4221, 2003.

SEDLÁKOVÁ, M.; URBÁNEK, K.; VOJTOVÁ, V.; SUCHÁNKOVÁ, H.; IMWENSI, P.; KOLÁŘ, M. Antibiotic consumption and its influence on the resistance in Enterobacteriaceae. **BMC Research Notes**, v. 7, n. 1, p. 454, 2014. doi:10.1186/1756-0500-7-454

SEIBERT, G.; HHÖRNER, R.; MENEGHETTI, B.H.; RIGHI, R.A.; FORNO, N.L.F.D.; SALLA, A. Nosocomial infections by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing enterobacteria in a teaching hospital. **Einstein (São Paulo)**, v. 12, p. 282-286, 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S1679-45082014AO3131>

SHAIKH, S.; FATIMA, J.; SHAKIL, S.; RIZVI, S.M.D.; KAMA, L.M.A. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 22, n. 1, p. 90-101, 2015.

SHARMA, V.; CHITRANSHI, N.; AGARWAL, A. K. Significance and Biological Importance of Pyrimidine in the Microbial World. **International Journal of Medicinal Chemistry**, v. 2014, n. 2014, p. 202784, 2014. doi:10.1155/2014/202784.

SINGH, P.; KUMAR, R.; SHARMA, B.K. Quantitative structure-activity relationship study of 5-iodo- and diaryl-analogues of tubercidin: inhibitors of adenosine kinase. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 5, p. 395–402, 2003.

SONDHI, S.M.; GOYAL, R.N.; LAHOTI, A.M.; SINGH, N.; SHUKLA, R.; RAGHUBIR, R. Synthesis and biological evaluation of 2-thiopyrimidine derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 9, p. 3185-3195, 2005.

SONI, R.; SINGH, G.; KAUR, R.; KAUR, G.; GILL, R.K.; BARIWAL, J. Chemistry & biology interface. **Chemistry & Biology**, v. 4, n. 3, p. 163-175, 2014.

SOUZA, E.S.; BELEI, R.A.; CARRILHO, C.M.D.; MATSUO, T.; YAMADA-OGATTA, S.F.; Andrade G., *et al.* Mortality and risks related to healthcare-associated infection. **Texto Contexto - Enfermagem**, v. 24, n. 1, p. 220-228, 2015.

STEENACKERS, H.P.; PARIJS, I.; FOSTER, K.R.; VANDERLEYDEN, J. Experimental evolution in biofilm populations. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 40, n. 3, p. 373-397, 2016.

TEGOS, G.P.; HAMBLIN, M.R. Disruptive innovations: new anti-infectives in the age of resistance. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 13, n. 5, p. 673-677, 2015.

TENG, S.O.; YEN, M.Y.; OU T.Y.; CHEN, F.L.; YU, F.L.; LEE, W. S. Comparison of pneumonia- and non-pneumonia-related *Acinetobacter baumannii* bacteremia: impact on empiric therapy and antibiotic resistance. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 48, n. 5, p. 525–530, 2015.

TERRA, M.R.; FURLANETO, M.C.; MAIA, L.F. Enterococcus multirresistente a antimicrobianos: um importante patógeno nosocomial. **Revista Uningá Review**, v. 29, n. 3, 2018.

TREEPONG, P.; KOS, V.N.; GUYEUX, C.; BLANC, D.S.; BERTRAND, X.; VALOT, B.; HOCQUET, D. Global emergence of the widespread *Pseudomonas aeruginosa* ST235 clone. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, n. 3, p. 289-294, 2018.

VENUGOPALA, K.N., *et al.* Design, synthesis, and characterization of (1-(4-aryl)- 1*H*-1,2,3-triazol-4-yl) methyl, substituted phenyl-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylates against *Mycobacterium tuberculosis*. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 10, p. 2681-2690, 2016.

VERDI, C.M; ZIMMERMANN, C.E.P; ANDRADE, E.N.C; LEDUR, P.C.; VELASQUE, P.G. Detecção laboratorial dos mecanismos de resistência da klebsiella pneumoniae: uma revisão. **Revista Saúde Integrada**, v. 9, n. 17, 2016.

VIJESH, A.M.; ISLOOR, A.M.; PEETHAMBAR, S.K.; SHIVANANDA, K.N.; ARULMOLI, T.; ISLOOR, N.A. Hantzsch reaction: synthesis and characterization of some new 1,4-dihydropyridine derivatives as potent antimicrobial and antioxidant agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 11, p. 5591–5597, 2011.

WARREN, J.W. Catheter-associated urinary tract infections. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 11, n. 3, p. 609-622, 1997.

WERKHEISER, W.C. Specific binding of 4-amino folic acid analogues by folic acid reductase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 236, n. 3, p. 888–893, 1961.

WERNER, G. Current trends of emergence and spread of vancomycin-resistant enterococci, antibiotic resistant bacteria - a continuous challenge in the new millennium. **IntechOpen**, 2012, DOI: 10.5772/29791.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Report on the burden of endemic health care-associated infection worldwide**. Geneva: WHO, 2011.

\_\_\_\_\_. **High levels of antibiotic resistance found worldwide, new data shows**. Geneva: WHO, 2018.

YAYAN, J.; GHEBREMEDHIN, B.; RASCHE, K. No Carbapenem Resistance in Pneumonia Caused by *Klebsiella* Species. **Medicine**, v. 94, n. 6, p. 527, 2015.

## **Anexos**

## Anexo A – Carta de Anuência – HE UFPel



### CARTA DE ANUÊNCIA

Declaramos para os devidos fins, que o projeto de pesquisa intitulado **Perfil de suscetibilidade de bactérias multirresistentes oriundas de dois hospitais em Pelotas** submetido para apreciação da Gerência de Ensino e Pesquisa do HE-UFPel/EBSEH, sob o protocolo nº 00734/18 pela pesquisadora **Marisa Castro Jara** e sob a orientação da Prof<sup>a</sup>. **Patrícia da Silva Nascente** está APROVADO para ser realizado no **Hospital Escola**.

Obs.: as amostras de culturas dos pacientes foram cedidas pela Instituição Hospitalar para realização da pesquisa.

A aprovação está condicionada ao cumprimento da pesquisadora aos requisitos da Resolução 466/12 e suas complementares e à entrega do Parecer Consubstanciado com a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa a esta gerência, comprometendo-se a utilizar os dados e materiais coletados, exclusivamente para os fins da pesquisa.

Pelotas, 05 de outubro de 2018.

Thiago Gonzalez Barbosa e Silva  
Chefe do Setor de Gestão da  
Pesquisa e Inovação Tecnológica  
HE-UFPel/Ebserh

## Anexo B – Carta de Anuência – Santa Casa de Misericórdia de Pelotas

### CARTA DE AUTORIZAÇÃO

Orientadora: Dra. Patrícia da Silva Nascente  
Orientanda: Marisa Castro Jara

Ao Ilmo (a) Sr(a) Chefia do Laboratório de Análises Clínicas da Santa Casa de Pelotas  
Bioquímica Luiza Souza Kern

Solicito a sua autorização para o desenvolvimento do estudo: “**Perfil de suscetibilidade de Bactérias Multirresistentes oriundas de dois Hospitais em Pelotas**” que tem por finalidade a construção de minha Tese. O objetivo do estudo O objetivo deste trabalho é analisar o perfil de suscetibilidade à antibióticos de bactérias oriundas de dois hospitais de Pelotas e testá-las frente a novos compostos de origem sintética; com o desenho de estudo a seguir:

Amostras a serem estudadas: Bactérias isoladas, identificadas e com perfil de multirresistência, estocadas no Laboratório da Unidade Hospitalar, adquiridas pelos serviços de cada um dos hospitais, que apresentarem resistência a pelo menos três classes de antibióticos no antibiograma, serão adquiridas através da cedência

Dados a serem coletados: Isolado bacteriano com identificação, antibiograma correspondente e laudo do paciente.

Avaliação e divulgação: Os dados serão analisados e publicados em revistas indexadas sem identificação de paciente ou do hospital.

As amostras de bactérias cedidas pelos hospitais serão estocadas no Laboratório de Microbiologia e Bioprospecção do DEMP – IB – UFPEL, para fins de testes futuros em novos compostos antibacterianos e descartados após os testes.

Na certeza de contar com vosso apoio, desde já agradeço colocando-me ao seu inteiro dispor para outros esclarecimentos por meio dos telefones: (53)981121101 e 33052593, e-mail: marisajara@terra.com.br

Atenciosamente,

Pelotas, 30 de abril de 2018

  
Pesquisador Responsável- Marisa castro Jara

  
Autorização do Laboratório Análise Clínicas da Santa Casa  
Luiza de Souza Kern



## Anexo C – Parecer do Consubstanciado do Comitê de Ética e Pesquisa (CEP)

UFPEL - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DE PELOTAS



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Perfil de suscetibilidade de Bactérias Multirresistentes oriundas de dois Hospitais em Pelotas

**Pesquisador:** MARISA CASTRO JARA

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 88857318.6.3001.5317

**Instituição Proponente:** HOSPITAL ESCOLA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.985.372

#### Apresentação do Projeto:

O aumento da resistência bacteriana a diferentes classes de antibióticos e a alta taxa de mortalidade tem impulsionado a corrida em busca de novos agentes antimicrobianos, principalmente os patógenos ESKAPE (Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa e Enterobacter spp.), que são conhecidos por sua virulência e resistência aos antibióticos existentes. As bactérias Gram-negativas têm causado grande preocupação pela produção da enzima betalactamase que inativa o antimicrobiano principalmente da classe dos Carbapenêmicos e as Betalactamases de espectro estendido. As bactérias Gram-positivas como o S. aureus são resistentes a metilicina (MRSA) e a vancomicina, linezolida e a daptomicina; assim como Enterococcus spp., que tem mostrado resistência à linezolida, a daptomicina e a resistência aumentada do Enterococcus faecium à ampicilina e à vancomicina (VRE).

#### Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é analisar o perfil de suscetibilidade à antibióticos de bactérias oriundas de dois hospitais de Pelotas e testá-las frente a novos compostos de origem sintética.

Objetivos específicos

**Endereço:** Av Duque de Caxias 250

**Bairro:** Fragata

**CEP:** 96.030-001

**UF:** RS

**Município:** PELOTAS

**Telefone:** (53)3284-4960

**Fax:** (53)3221-3554

**E-mail:** cep.famed@gmail.com

**UFPEL - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DE PELOTAS**



Continuação do Parecer: 2.985.372

- (1) Levantar dados de suscetibilidade aos antimicrobianos de bactérias isoladas clinicamente de Unidade de Terapia Intensiva (UTI), enfermarias, leitos particulares, ambulatorios e atendimento domiciliar em dois hospitais de Pelotas.
- (2) Identificar a prevalência das bactérias multirresistentes nos dois hospitais estudados.
- (3) Identificar os isolados bacterianos com maior resistência frente aos antibióticos utilizados atualmente.
- (4) Relacionar os isolados e o perfil de resistência com a origem clínica da amostra.
- (5) Mapear a frequência das bactérias Multirresistentes nas UTIs, enfermarias, leitos particulares, ambulatorios e atendimento domiciliar.
- (6) Verificar a suscetibilidade de bactérias multiresistentes frente a novos compostos de origem sintética.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Não haverá risco aos pacientes, pois será cedida uma alíquota das culturas que serão auto-clavadas pelas instituições.

A pesquisa trará como benefício uma informação fundamental no estudo epidemiológico de doenças direcionadas a cidade de Pelotas e especificamente a cada hospital do estudo. Com este levantamento será apresentados o perfil de resistência de todas as bactérias de origem hospitalar com resistência a pelo menos três classes de antibióticos, proporcionando conhecimento e consequentemente meios de solucionar possíveis problemas. Os mesmos micro-organismos serão testados com novos fármacos para que novas alternativas de tratamento para enfermidades causadas por esses micro-organismos sejam investigadas.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Os isolados bacterianos serão obtidos dos Laboratórios de Análises Clínicas dos Hospitais que serão nomeados como hospital A (Santa Casa de Misericórdia de Pelotas) e B (Hospital Escola-EBSERH); a partir das culturas de pacientes internados nas UTIs, enfermarias, leitos particulares, ambulatorios e atendimento domiciliar. O material biológico do paciente não será coletado especificamente para esse projeto. A coleta será realizada conforme solicitação de rotina e protocolo da instituição e necessidade. Após análise e estocagem ou incineração do material biológico do paciente pelo hospital, será solicitada a cedência de uma alíquota a instituição. As amostras bacterianas já isoladas e identificadas pelos serviços de cada um dos hospitais e cedidas por eles, passarão por uma seleção de acordo com perfil de suscetibilidade, onde serão utilizados apenas aqueles micro-organismos que apresentarem RESISTÊNCIA A PELO MENOS TRÊS CLASSES

**Endereço:** Av Duque de Caxias 250

**Bairro:** Fragata

**CEP:** 96.030-001

**UF:** RS

**Município:** PELOTAS

**Telefone:** (53)3284-4960

**Fax:** (53)3221-3554

**E-mail:** cep.famed@gmail.com

**UFPEL - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DE PELOTAS**



Continuação do Parecer: 2.985.372

DE ANTIBIÓTICOS NO ANTIBIOGRAMA. Os critérios de inclusão e exclusão serão direcionados aos micro-organismos e não aos pacientes, pois as amostras biológicas não serão identificadas e não existirão informações ou características dos pacientes e sim apenas o perfil de suscetibilidade das bactérias isoladas. Será verificada a frequência de resistentes e sensíveis de cada espécie bacteriana frente a cada antibiótico comparando os dois hospitais. As amostras serão estocadas no Laboratório de Microbiologia e Bioprospecção do DEMP – IB – Ufpel para posteriores testes com novos compostos de origem sintética.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Projeto propõe dispensa do TCLE, pois serão usadas alíquotas de amostras biológicas destinadas ao descarte por autoclavagem.

As cartas de autorização dos dois hospitais que participarão da pesquisa estão corretas e assinadas.

**Recomendações:**

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

OK

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

| Tipo Documento                            | Arquivo                               | Postagem               | Autor                 | Situação |
|-------------------------------------------|---------------------------------------|------------------------|-----------------------|----------|
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | Projeto_IH_2hosp_Pel_Par_Cons_v_3.pdf | 09/10/2018<br>22:58:14 | MARISA CASTRO<br>JARA | Aceito   |
| Outros                                    | Carta_anuencia_HE_EBSEH_Nova.pdf      | 09/10/2018<br>22:56:20 | MARISA CASTRO<br>JARA | Aceito   |
| Outros                                    | Anexo_CLSI_M07_A9.pdf                 | 02/07/2018<br>16:06:31 | MARISA CASTRO<br>JARA | Aceito   |
| Outros                                    | Carta_Autorizacao_Santa_Casa.pdf      | 01/05/2018<br>21:01:08 | MARISA CASTRO<br>JARA | Aceito   |

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Endereço:** Av Duque de Caxias 250

**Bairro:** Fragata

**CEP:** 96.030-001

**UF:** RS

**Município:** PELOTAS

**Telefone:** (53)3284-4960

**Fax:** (53)3221-3554

**E-mail:** cep.famed@gmail.com

UFPEL - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DE PELOTAS



Continuação do Parecer: 2.985.372

PELOTAS, 27 de Outubro de 2018

---

**Assinado por:**  
**Patricia Abrantes Duval**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** Av Duque de Caxias 250

**Bairro:** Fragata

**CEP:** 96.030-001

**UF:** RS

**Município:** PELOTAS

**Telefone:** (53)3284-4960

**Fax:** (53)3221-3554

**E-mail:** cep.famed@gmail.com



## Anexo D – Parecer do Consubstanciado Nacional do Comitê de Ética e Pesquisa (CONEP)

COMISSÃO NACIONAL DE  
ÉTICA EM PESQUISA



### PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Perfil de suscetibilidade de Bactérias Multirresistentes oriundas de dois Hospitais em Pelotas

**Pesquisador:** MARISA CASTRO JARA

**Área Temática:** Projetos de pesquisa que envolvam organismos geneticamente modificados (OGM), células-tronco embrionárias e organismos que representem alto risco coletivo, incluindo organismos relacionados a eles, nos âmbitos de: experimentação, construção, cultivo, manipulação, transporte, transferência, importação, exportação, armazenamento, liberação no meio ambiente e descarte;

**Versão:** 2

**CAAE:** 88857318.6.0000.5337

**Instituição Proponente:** Santa Casa de Misericórdia de Pelotas

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.880.831

#### Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa e projeto detalhado disponíveis respectivamente em: "PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_1087306.pdf" e "Projeto\_IH\_2hosp\_Pel\_Par\_Cons.pdf" postados na Plataforma Brasil em 02/07/2018.

#### INTRODUÇÃO

Os agentes antimicrobianos descobertos em meados do século XX trouxeram a cura a de milhares de pessoas; no entanto, com a terapia abusiva de antibióticos na medicina humana, veterinária e na produção de alimentos têm aumentado a resistência dos patógenos aos antibióticos (Argudin et al., 2017; Macintyre & BUI, 2017). Com o declínio de descobertas de novas drogas antibióticas até os dias atuais em contrapartida com a evolução das bactérias Gram-negativas em adquirirem resistência a múltiplas classes de antimicrobianos por possuírem eficientes mecanismos disseminativos entre bactérias patogênicas e comensais da mesma ou de diferentes espécies, têm causado sérias preocupações de grande consequência para a saúde pública global (Mukerji et al.,

**Endereço:** SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.719-049

**UF:** DF

**Município:** BRASILIA

**Telefone:** (61)3315-5877

**E-mail:** conep@saude.gov.br

## COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 2.880.831

2017). Outro grupo de bactérias, que têm apresentado constante resistência à drogas antimicrobianas de última geração são os cocos Gram-positivos, de grande preocupação na atualidade por promoverem infecções graves e letais, tais como pneumonia, meningite e infecções de pele (Bomfim, 2017). A resistência bacteriana aos antibióticos tem sido encontrada especialmente nos patógenos bacterianos ESKAPE (E. faecium, S. aureus, K. pneumoniae, A. baumannii, P. aeruginosa e Enterobacter spp.), os quais são os principais causadores de infecções nosocomiais no mundo todo (Argudin et al., 2017). A mortalidade por bactérias Gram-negativas multirresistentes são causadas por infecções urinárias, infecções de sangue (sepsis), pneumonia, meningite, diarreia, gonorréia, otite, infecções oculares, infecções ocasionadas pela utilização de cateter vascular central e infecções intra-abdominais ou feridas (Exner et al., 2017). Segundo divulgação de dados pela Organização Mundial da saúde (OMS), a aquisição de múltiplos genes, ocasionada pela propagação das bactérias, aponta que até 2050 as cepas resistentes poderão vitimar 10 milhões de pessoas por ano no mundo, superior ao número de mortalidade pelo câncer, estimado que atinja cerca de 8,2 milhões de pessoas ao ano (De Kraker et al., 2017). Apesar dessa expectativa de causar morbidade e mortalidade em todo o mundo num futuro não muito distante, é importante salvaguardar os antibióticos que necessitam de um gerenciamento e união entre os países abrangendo todos os setores que envolvem a saúde dos seres do planeta, pelo precário desenvolvimento de novos medicamentos (Brinkac et al., 2017). Da mesma forma, novos compostos devem ser estudados para que possam surgir novas alternativas terapêuticas acessíveis.

### HIPÓTESE

Bactérias multirresistentes estão presentes em amostras clínicas provenientes de pacientes atendidos em hospitais da cidade de Pelotas. Bactérias multirresistentes são sensíveis a novos compostos sintéticos.

### METODOLOGIA

Bactérias multirresistentes hospitalares

Os isolados bacterianos serão obtidos dos Laboratórios de Análises Clínicas dos Hospitais que serão nomeados como hospital A e B; a partir das culturas de pacientes internados nas UTIs, enfermarias, leitos particulares, ambulatorios e atendimento domiciliar. As amostras serão selecionadas a partir do antibiograma que apresentarem resistência a pelo menos três classes de antibióticos, serão selecionadas um N de 200 amostras aproximadamente; destas serão utilizadas

**Endereço:** SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.719-049

**UF:** DF

**Município:** BRASILIA

**Telefone:** (61)3315-5877

**E-mail:** conep@saude.gov.br

## COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 2.880.831

três cepas de cada espécie e/ou gênero para testar as bactérias multirresistentes em compostos orgânicos sintéticos. A identificação da espécie e gênero, assim como o antibiograma será realizada através dos sistemas VITEK 2 – Biomerieux (hospital A) e BD PHOENIX (Hospital B).

As bactérias cedidas pelas unidades hospitalares serão encaminhadas e estocadas no Laboratório de Micologia e Bioprospecção - DEMP – IB - UFPEL, para fins de testes futuros em novos compostos antibacterianos. As cepas serão aliquotadas por swab de transporte (Stuart estéril), do meio de cultura do teste do paciente e serão acondicionadas dentro de caixa térmica impermeável, higienizável, contendo gelo reciclável, com termômetro (temperatura mantida entre 2 e 8° C), e com identificação de "Risco Biológico". No Laboratório de Micologia e Bioprospecção - DEMP – IB - UFPEL de as cepas serão ativadas em Ágar Tríplice Soja (TSA) a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  por  $48 \pm 2$  horas e serão inoculadas em caldo infusão cérebro-coração (BHI) com 20% de glicerol e leite desnatado a 15%, distribuídos previamente em microtubos graduados de 1,5 mL. Após a distribuição nos microtubos, estes serão mantidos por refrigeração por 5 dias, e posteriormente armazenados em freezer de  $-10$  a  $-20^\circ\text{C}$ .

Após os testes das cepas, o material biológico será descartado em sacos plásticos autoclavados a  $121^\circ\text{C}$  por 15 minutos em 1 atm de pressão no Laboratório de Micologia e Bioprospecção (DEMP) – IB - UFPEL

### Ensaio

A atividade antibacteriana dos compostos será verificada pelo cálculo da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) por meio da técnica de Microdiluição em Caldo, de acordo com o documento M07-A9, descrito pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012).

### Compostos sintéticos orgânicos

Os compostos dihidropirimidinonas (DHPM) que serão testados possuem substituição na posição C-4 do anel fenila ou benzila (4-metoxifenil, e p-toluil-4-clorofenil). As três séries das moléculas pertencem a classe de DHPM [6-metil-2-oxo-4-(4-metóxiifenil)-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxilato de etila], [6-metil-2-oxo-4-(p-toluil)-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxilato de etila] e [6-metil-2-oxo-4-(4-clorofenil)-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxilato de etila], que serão sintetizados no laboratório de Lipidômica e Bio-orgânica da UFPEL; assim como estão sendo sintetizadas novas moléculas ainda em estudo, sem identificação, e que poderão ser utilizadas para testes futuros.

**Endereço:** SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.719-049

**UF:** DF

**Município:** BRASILIA

**Telefone:** (61)3315-5877

**E-mail:** conep@saude.gov.br



## COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 2.880.831

### **Objetivo da Pesquisa:**

#### **OBJETIVO PRIMÁRIO**

O objetivo deste trabalho é analisar o perfil de suscetibilidade à antibióticos de bactérias oriundas de dois hospitais de Pelotas e testá-las frente a novos compostos de origem sintética.

#### **OBJETIVOS SECUNDÁRIOS**

(1) Levantar dados de suscetibilidade aos antimicrobianos de bactérias isoladas clinicamente de Unidade de Terapia Intensiva (UTI), enfermarias, leitos particulares, ambulatorios e atendimento domiciliar em dois hospitais de Pelotas. (2) Identificar a prevalência das bactérias multirresistentes nos dois hospitais estudados. (3) Identificar os isolados bacterianos com maior resistência frente aos antibióticos utilizados atualmente. (4) Relacionar os isolados e o perfil de resistência com a origem clínica da amostra. (5) Mapear a frequência das bactérias Multirresistentes nas UTIs, enfermarias, leitos particulares, ambulatorios e atendimento domiciliar. (6) Verificar a suscetibilidade de bactérias multirresistentes frente a novos compostos de origem sintética.

### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

#### **RISCOS**

Não serem encontradas e identificadas bactérias multirresistentes nas amostras clínicas dos hospitais de pelotas. Os compostos testados não possuem atividade antibacteriana.

#### **BENEFÍCIOS**

Conhecimento e organização de dados epidemiológicos quanto à presença de bactérias multirresistentes em hospitais da cidade de Pelotas. Descobrir atividade antimicrobiana nos novos compostos testados em bactérias multirresistentes.

### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O protocolo de pesquisa foi inserido como pertencente à área temática "Projetos de pesquisa que envolvam organismos geneticamente modificados (OGM), células-tronco embrionárias e organismos que representem alto risco coletivo, incluindo organismos relacionados a eles, nos âmbitos de: experimentação, construção, cultivo, manipulação, transporte, transferência, importação, exportação, armazenamento, liberação no meio ambiente e descarte" e apresenta as seguintes características:

**Endereço:** SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.719-049

**UF:** DF

**Município:** BRASILIA

**Telefone:** (61)3315-5877

**E-mail:** conep@saude.gov.br



## COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 2.880.831

O presente estudo analisará o perfil de suscetibilidade aos antibióticos de bactérias oriundas de dois hospitais de Pelotas e testará frente a novos compostos de origem sintética. A identificação da espécie e gênero, assim como o antibiograma será realizada através dos sistemas VITEK 2 – Biomerieux (hospital A) e BD PHOENIX (Hospital B). As amostras de bactérias serão obtidas a partir das análises cultural bacteriana com antibiograma, requisitadas pelo corpo clínico dos pacientes internados nas UTIs, enfermarias, leitos particulares e também de pacientes com atendimentos ambulatoriais e domiciliares. A coleta dos dados dos resultados será obtida através dos laudos com a identificação das cepas bacterianas e dos antibiogramas dos micro-organismos que apresentarem resistência a pelo menos três classes de antibióticos. Os dados da pesquisa serão avaliados através dos resultados dos laudos dos pacientes em estudo, após os dados obtidos serão divulgados como artigo em revistas indexadas. As amostras de bactérias cedidas pelos hospitais serão estocadas no Laboratório de Micologia e Parasitologia do DEMP – IB - UFPEL, para fins de testes futuros em novos compostos antibacterianos e descartados após os testes futuros em novos compostos antibacterianos.

Embora o protocolo não se enquadre na área de apreciação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - Conep, conforme preconizado no item IX.4 da Resolução CNS nº 466 de 2012, segue (m) inadequação (ões) para correção antes do início da pesquisa; cabendo ao CEP verificar o cumprimento das inadequações do protocolo pelo (a) pesquisador (a). Vide campo "Recomendações".

### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Vide campo "Recomendações".

### **Recomendações:**

1. Solicita-se retirar a indicação de que se trata de pesquisa da área temática "Projetos de pesquisa que envolvam organismos geneticamente modificados (OGM), células-tronco embrionárias e organismos que representem alto risco coletivo, incluindo organismos relacionados a eles, nos âmbitos de: experimentação, construção, cultivo, manipulação, transporte, transferência, importação, exportação, armazenamento, liberação no meio ambiente e descarte" no cadastro do protocolo de pesquisa na Plataforma Brasil, uma vez que esse estudo não se enquadra na área temática selecionada (Resolução CNS nº 466 de 2012, item IX.4 e Carta Circular nº 172/2017/CONEP/CNS/MS).

**Endereço:** SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.719-049

**UF:** DF

**Município:** BRASILIA

**Telefone:** (61)3315-5877

**E-mail:** conep@saude.gov.br

## COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 2.880.831

2. Quanto à folha de rosto, arquivo "Folha\_de\_rosto\_Marisa.pdf", postado na Plataforma Brasil em 02/05/2018: solicita-se o preenchimento do campo "UNIDADE/ÓRGÃO" referente à Instituição Proponente. Ainda, apesar de estar descrito que se trata da assinatura do diretor clínico, o carimbo não identifica o Dr. Alexander G. Sacco como tal, mas como "Nefrologia Medicina Interna". Solicitam-se esclarecimentos e adequação da folha de rosto, devendo estar assinada pelo seu responsável maior pela instituição ou seu substituto. Sendo assim, solicita-se apresentar nova Folha de Rosto com as informações solicitadas e adequadamente digitalizada (Norma Operacional CNS nº 001 de 2012, item 3.3.a).

3. Quanto às informações do projeto de pesquisa detalhado referente ao arquivo "Projeto\_IH\_2hosp\_Pel\_Par\_Cons.pdf", gerado na Plataforma Brasil em 02/07/2018, seguem as considerações:

3.1 Na página 5 de 7 lê-se: "Os isolados bacterianos serão obtidos dos Laboratórios de Análises Clínicas dos Hospitais que serão nomeados como hospital A e B; A PARTIR DAS CULTURAS DE PACIENTES INTERNADOS NAS UTIS, ENFERMARIAS, LEITOS PARTICULARES, AMBULATÓRIOS E ATENDIMENTO DOMICILIAR." (Destaque nosso).

Considerando o disposto acima:

3.1.1. Solicitam-se esclarecimentos sobre quais são os hospitais A e B e solicita-se inserir na Plataforma Brasil declaração contendo a anuência das instituições participantes referente às amostras cedidas para o estudo (Norma Operacional CNS nº 001 de 2013, itens 3.3.h e 3.3.i).

3.1.2. Solicitam-se esclarecimentos quanto a se a coleta de material biológico dos pacientes internados será específica para a realização desta pesquisa. Cabe lembrar que o material biológico é do paciente e caso seja coletado para fins de pesquisa, as amostras PERTENCEM AO PARTICIPANTE DA PESQUISA, que irá conceder ou não para o uso na pesquisa. Portanto, em caso afirmativo, solicita-se a formulação do TCLE no qual o pesquisador comunica ao possível participante ou responsável como será a pesquisa para a qual está sendo convidado, fornecendo as informações necessárias para decidir livremente se quer participar ou não do estudo. O documento deve ser elaborado em linguagem clara e acessível, descrevendo a justificativa, os objetivos, os procedimentos, os desconfortos e os riscos possíveis, os benefícios esperados, os métodos alternativos existentes, a forma de acompanhamento e assistência, bem como seus responsáveis, a garantia de sigilo, as formas de ressarcimento de despesas decorrentes da participação na pesquisa, as formas de indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa, dentre outras informações que sejam relevantes ao participante( capítulo IV da

**Endereço:** SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.719-049

**UF:** DF

**Município:** BRASILIA

**Telefone:** (61)3315-5877

**E-mail:** conepe@saude.gov.br

## COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 2.880.831

Resolução CNS Nº 466 de 2012).

3.4. Na página 2 de 7 lê-se: "As amostras bacterianas já isoladas e identificadas pelos serviços de cada um dos hospitais, que apresentarem RESISTÊNCIA A PELO MENOS TRÊS CLASSES DE ANTIBIÓTICOS NO ANTIBIOGRAMA [...]" (Destaque nosso). Conforme descrito no trecho, ocorrerá seleção para as amostras a serem utilizadas no estudo. Portanto, solicita-se que constem no Projeto Detalhado os critérios de inclusão e exclusão dos participantes da pesquisa, devendo-se apresentá-los de acordo com o previsto na Norma Operacional CNS nº 001 de 2013, item 3.4.1.11.

4. Quanto à Carta de Autorização referente ao arquivo "Carta\_Autorizacao\_Santa\_Casa.pdf" postado na Plataforma Brasil:

No documento lê-se: "Dados a serem coletados: Isolado bacteriano com identificação, antibiograma correspondente e LAUDO DO PACIENTE." (Destaque nosso). Ainda, no arquivo "PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_1087306.pdf" de 02/07/2018 lê-se: "OS DADOS DA PESQUISA SERÃO AVALIADOS ATRAVÉS DOS RESULTADOS DOS LAUDOS DOS PACIENTES EM ESTUDO, após os dados obtidos serão divulgados como artigo em revistas indexadas." (Destaque nosso). Apesar do pesquisador informar que não terá contato com pacientes, a justificativa para a dispensa de TCLE deverá ser fundamentada, tendo em visto que, o material biológico é do paciente, conforme regulamento do Conselho Federal de Medicina, assim como os laudos do paciente, não cabendo ao hospital autorizar os laudos e a coleta de material biológico humano para o uso da pesquisa. Deve ser levado em consideração que o paciente se encontra internado nas UTIs, enfermarias, leitos particulares e também de pacientes com atendimentos ambulatoriais e domiciliares (caso o hospital disponha desses serviços), isto é, o pesquisador poderá entrar em contato com tais potenciais participantes. Portanto, solicitam-se esclarecimentos sobre a real inviabilidade da obtenção da obtenção do TCLE.

5. Solicita-se a garantia dos procedimentos que assegurem a confidencialidade dos dados e a privacidade, a proteção da imagem e a não estigmatização dos participantes da pesquisa e a garantia de manutenção do sigilo e da privacidade dos participantes da pesquisa durante todas as fases da pesquisa (Resolução CNS nº 466 de 2012, itens III.2.i e IV.3.e) e os procedimentos a serem adotados para a garantia da confidencialidade, privacidade e segurança no tratamento dos dados (Resolução CNS nº 466 de 2012, itens III.2.i e IV.3.e).

**Endereço:** SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.719-049

**UF:** DF

**Município:** BRASILIA

**Telefone:** (61)3315-5877

**E-mail:** conep@saude.gov.br



## COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 2.880.831

6. Quanto às Informações Básicas da pesquisa, arquivo "PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_1087306.pdf", gerado na Plataforma Brasil em 02/07/2018, seguem as seguintes considerações:

6.1. No campo "RISCOS" lê-se: "Não serem encontradas e identificadas bactérias multirresistentes nas amostras clínicas dos hospitais de pelotas. Os compostos testados não possuem atividade antibacteriana.". O campo "risco" na Plataforma Brasil é destinado a informar qualquer possibilidade de danos à dimensão física, psíquica, moral, intelectual, social, cultural ou espiritual do ser humano, em qualquer pesquisa e dela decorrente, isto é, qualquer dano direto/indireto, bem como tardio/imediato, AO PARTICIPANTE DE PESQUISA e não à execução do estudo em si. Solicita-se esclarecer sobre outras possíveis complicações que podem ser de maior gravidade na coleta de sangue, tais como tromboflebite na veia puncionada, celulite local, infecções, punção acidental de outras estruturas anatômicas circunvizinhas como artérias e nervos e apresentação das providências e cautelas a serem empregadas para evitar e/ou reduzir efeitos e condições adversas que possam causar dano, considerando características e contexto do participante da pesquisa (item IV.3.b da Resolução CNS nº 466 de 2012). Solicitam-se adequações, incluindo a informação no campo "Risco", na Aba 4 - Detalhamento do Estudo, na Plataforma Brasil (Resolução CNS nº 466 de 2012, item II.22).

6.2. No campo "BENEFÍCIOS" lê-se: "Conhecimento e organização de dados epidemiológicos quanto à presença de bactérias multirresistentes em hospitais da cidade de Pelotas. Descobrir atividade antimicrobiana nos novos compostos testados em bactérias multirresistentes.". As informações acerca dos potenciais benefícios devem ser descritas de forma específica, clara e objetiva, explicando, em linguagem clara e acessível, os potenciais benefícios relacionados à participação no estudo (Resolução CNS nº 466 de 2012, itens III.1.b e IV.3.b).

6.3. Na página 4 de 5, no cronograma de execução, consta que a coleta das amostras estava prevista para 20/05/2018, isto é, o estudo já teria sido iniciado. Sendo assim, solicita-se esclarecimento sobre se a pesquisa já foi iniciada. Caso ainda não tenha sido, solicita-se adequação do cronograma com relação à data de início do estudo, dado que este ainda se encontra em análise no Sistema CEP/Conep até a presente data. Solicita-se adequação (Norma Operacional CNS nº 001 de 2013, item 3.3.f).

7. O projeto de pesquisa é o documento fundamental para que o Sistema CEP-CONEP possa proceder à análise ética da proposta, devendo ser formulado pelo pesquisador. Os itens do projeto variam de acordo com sua natureza e procedimentos metodológicos utilizados (Norma

**Endereço:** SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.719-049

**UF:** DF

**Município:** BRASILIA

**Telefone:** (61)3315-5877

**E-mail:** conep@saude.gov.br

## COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 2.880.831

Operacional CNS nº 001 de 2013, item 3.4.). Já o arquivo "PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO" é gerado pelo Sistema Plataforma Brasil e as informações presentes são inseridas pelo pesquisador responsável ao realizar o cadastro do estudo para avaliação ética. Nesse sentido, o que está apresentado no arquivo "PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO" já deve estar contemplado no projeto de pesquisa quando do envio para análise ética. Portanto, solicita-se que as informações contidas nos documentos "Projeto Detalhado" e "PB Informações Básicas" sejam atualizadas de forma a não existir incoerências de conteúdo, principalmente no que diz respeito aos objetivos e metodologia do estudo. Solicitam-se adequações.

### Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto, a CONEP entende que o protocolo de pesquisa não se enquadra na Área Temática "Projetos de pesquisa que envolvam organismos geneticamente modificados (OGM), células-tronco embrionárias e organismos que representem alto risco coletivo, incluindo organismos relacionados a eles, nos âmbitos de: experimentação, construção, cultivo, manipulação, transporte, transferência, importação, exportação, armazenamento, liberação no meio ambiente e descarte" (considerando as informações do item IX.4 da Resolução CNS nº 466 de 2012 e da Carta Circular nº 172/2017/CONEP/CNS/MS).

### Considerações Finais a critério da CONEP:

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - Conep - delibera pela devolução do protocolo de pesquisa ao Comitê de Ética em Pesquisa - CEP, por não se enquadrar em nenhuma das áreas temáticas descritas no item IX.4 da Resolução CNS nº 466 de 2012.

Portanto, esta comissão delibera por devolver o protocolo em questão, solicitando a esse

Comitê que acompanhe o atendimento às questões acima e informando que após análise e aprovação do CEP o estudo pode ser iniciado.

### Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento                 | Arquivo                                       | Postagem               | Autor              | Situação |
|--------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------|--------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1087306.pdf | 02/07/2018<br>16:08:47 |                    | Aceito   |
| Outros                         | Anexo_CLSI_M07_A9.pdf                         | 02/07/2018<br>16:06:31 | MARISA CASTRO JARA | Aceito   |
| Projeto Detalhado              | Projeto_IH_2hosp_Pel_Par_Cons.pdf             | 02/07/2018             | MARISA CASTRO      | Aceito   |

**Endereço:** SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.719-049

**UF:** DF

**Município:** BRASILIA

**Telefone:** (61)3315-5877

**E-mail:** conep@saude.gov.br

# COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 2.880.831

|                         |                                     |                        |                       |        |
|-------------------------|-------------------------------------|------------------------|-----------------------|--------|
| / Brochura Investigador | Projeto_IH_2hosp_Pel_Par_Cons.pdf   | 16:02:05               | JARA                  | Aceito |
| Folha de Rosto          | Folha_de_rosto_Marisa.pdf           | 02/05/2018<br>23:18:00 | MARISA CASTRO<br>JARA | Aceito |
| Outros                  | Carta_Autorizacao_Santa_Casa.pdf    | 01/05/2018<br>21:01:08 | MARISA CASTRO<br>JARA | Aceito |
| Outros                  | CARTA_DE_ANUENCIA_UFPEL_EBSE RH.pdf | 29/04/2018<br>20:33:07 | MARISA CASTRO<br>JARA | Aceito |

## Situação do Parecer:

Devolvido com Recomendação

BRASILIA, 08 de Setembro de 2018

---

**Assinado por:**  
**Gabriela Marodin**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.719-049

**UF:** DF

**Município:** BRASILIA

**Telefone:** (61)3315-5877

**E-mail:** conep@saude.gov.br

## Anexo E – Comprovante de submissão do artigo

Successfully received: submission Multidrug-resistant hospital bacteria:  
Epidemiological factors and susceptibility profile for Microbiological Research

**De:** Microbiological Research <Evisesupport@elsevier.com>

**Para:**  
marisajara@terra.com.br

**Data:** Ter 21/05/19 17:41

*This message was sent automatically.*

Ref: MICRES\_2019\_509

Title: Multidrug-resistant hospital bacteria: Epidemiological factors and susceptibility profile

Journal: Microbiological Research

Dear Mrs. Jara,

Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in Microbiological Research. Your submission was received in good order.

To track the status of your manuscript, please log into EVISE® at:

[http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL\\_ACR=MICRES](http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=MICRES) and locate your submission under the header 'My Submissions with Journal' on your 'My Author Tasks' view.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Microbiological Research

**Have questions or need assistance?**

For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

---

Copyright © 2018 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)

Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, Reg. No. 33156677.