

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Daniella Cristina Rodrigues Pereira

**CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE ISOLADOS CLÍNICOS DE
Acinetobacter baumannii A ANTIMICROBIANOS E DESINFETANTE
HOSPITALAR**

Rio de Janeiro

2013

Daniella Cristina Rodrigues Pereira

**CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE ISOLADOS CLÍNICOS DE
Acinetobacter baumannii A ANTIMICROBIANOS E DESINFETANTE
HOSPITALAR**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária

Orientadoras: Dra. Maria Helena Simões Villas Bôas

Dra. Marta de Campos Neves

Rio de Janeiro

2013

Pereira, Daniella Cristina Rodrigues

Caracterização da resistência de isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* a antimicrobianos e desinfetante hospitalar./Daniella Cristina Rodrigues Pereira - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2013.

104 f.; il.

Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária; Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, 2013.

Orientadora: Maria Helena Simões Villas Bôas e Marta de Campos Neves

1. *Acinetobacter baumannii*.
2. Antimicrobianos.
3. Desinfetantes.
4. Resistência.
5. Vigilância Sanitária

Characterization of resistance of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to antibiotics and hospital disinfectant.

Daniella Cristina Rodrigues Pereira

**CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE ISOLADOS CLÍNICOS DE
Acinetobacter baumannii A ANTIMICROBIANOS E DESINFETANTE
HOSPITALAR**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Vigilância Sanitária

Orientadoras: Maria Helena Simões Villas Bôas
Marta de Campos Neves

Aprovado em 22 / 08 / 2013

COMISSÃO EXAMINADORA

Dra. Verônica Viana Vieira
Instituto Nacional de Controle de Qualidade – Fundação Oswaldo Cruz

Profa. Dra. Prescilla Emy Nagao
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Profa. Dra. Célia Maria Carvalho Pereira Araujo Romão
Instituto Nacional de Controle de Qualidade – Fundação Oswaldo Cruz

Dra. Maria Helena Simões Villas Bôas-Orientadora
Instituto Nacional de Controle de Qualidade – Fundação Oswaldo Cruz

AGRADECIMENTOS

Inicio meus agradecimentos a Deus, Autor da Vida, por ter me concedido a oportunidade de realizar todo este trabalho e colocar pessoas tão especiais ao meu lado, sem as quais certamente não teria conseguido!!!

Aos meus pais, **Irani e Júlio**, meu infinito agradecimento. Sempre me incentivaram a nunca desistir dos meus sonhos e acreditaram que um dia chegaria até aqui. Obrigada pelo amor incondicional!

Ao grande amor e alegria da minha vida, **Daniel**, obrigada filho por sempre compreender as minhas ausências, por me contagiar com sua alegria de viver, me inspirar e dar forças para continuar a camininhada. Você é o melhor projeto já idealizado!! Te amo para sempre!!!

Ao meu esposo **Dario**, por todos os momentos compartilhados juntos e mesmo com todas as dificuldades e diferenças, sempre estive ao meu lado, muito presente em relação ao nosso filho, cuidado com muito amor e consolando-o nos momentos em que não estive presente, sem a sua ajuda jamais teria conseguido, obrigada do fundo do meu coração!!!

À minha orientadora, **Dr^a Maria Helena Simões Villas Bôas**, que acreditou em mim e confiou que pudesse desenvolver este projeto. Sempre disponível, paciente e disposta a ajudar. Obrigada por tudo que fez por mim, nunca esquecerei sua ajuda!!!

À minha co-orientadora, **Dr^a Marta de Campos Neves**, não tenho palavras para agradecer, aos poucos deixou de ser co-orientadora e tornou-se uma grande amiga, com quem dividi por três anos minhas alegrias, angústias, frustrações e conhecimento. Você é uma parceira que gostaria de trabalhar até me aposentar. Torço muito pelo seu sucesso, você é muito especial como pessoa e profissional. Obrigada por tudo que me ensinou!

Às minhas amigas de trabalho, **Bruna Peres Sabagh e Célia Maria Carvalho Pereira Romão**, trabalhar com vocês é um enorme prazer, o que aprendi com vocês em todos esses anos foi uma experiência única. Além de tudo esse ambiente de amizade e de harmonia que temos, acho difícil encontrar em outro lugar, é uma raridade encontrar pessoas no mundo como vocês. Obrigada pela compreensão, amizade, companheirismo, ensino e pelo carinho de vocês!!!

Aos amigos do Setor Saneantes (ativos e afastados), **Gessy Fernandes, Rodrigo Rollin, Alessandra Oliveira, Aline Souto, Cristina Ferreira, Priscilla Rito, Bruna Petillo, Clarisse Rodrigues e Tamara Lobo**, obrigada por toda ajuda, amizade e por conseguirem manter neste laboratório um ótimo ambiente de trabalho. Vocês realmente sabem como trabalhar em equipe.

Às minhas amigas mães e companheiras de sempre, **Andréa Larangeira, Patrícia Brito, Raquel López, Souliane Sousa e Ana Paula Alcides**, por me valorizarem como pessoa. Todas vocês provaram que realmente só querem o meu bem, pois sempre estiveram ao meu lado nos momentos mais difíceis que passei. Vocês são amigas inesquecíveis, moram no meu coração e para sempre! Obrigada pela valiosa amizade de vocês!!!

À **Dr^a Neide Hiromi Miyazaki** (*in memoriam*), a grande idealizadora deste projeto, infelizmente não pode participar e ver sua conclusão. Mas seus ensinamentos e sonhos permanecem vivos em cada um de nós do Setor de Saneantes.

A todos da Central de Esterilização e do Setor de Meio de Cultura, pela presteza em ajudar e entregar os meios e materiais solicitados. Em especial aos amigos **Jorge e Cátia**, que é mais que uma amiga, uma irmã por quem tenho muito carinho e desejo uma vida de muita paz, alegria e realizações. Sucesso aos dois amigos!

À Coordenação da Pós-graduação, **Dr^a Kátia Leandro, Dr^o Fábio Amendoeira, Raquel, Sâmela, Giselle e Gorette** pela gentileza e cordialidade que sempre nos atendem, sempre prontas a nos ajudar quando precisamos.

Agradeço ao INCQS, representado pelo diretor **Eduardo Leal**, pelo incentivo e por permitir que os servidores desta instituição possam buscar cada vez mais conhecimento técnico e científico. Obrigada por me dar a oportunidade de realizar um sonho!

EPÍGRAFE

Antes de ser mãe, eu fazia e comia
os alimentos ainda quentes.
Eu não tinha roupas manchadas,
tinha calmas conversas ao telefone.

Antes de ser mãe, eu dormia o quanto eu queria,
Nunca me preocupava com a hora de ir para a cama.
Eu não me esquecia de escovar os cabelos e os dentes

Antes de ser mãe,
eu limpava minha casa todo dia.
Eu não tropeçava em brinquedos e
nem pensava em canções de ninar.

Antes de ser mãe, eu não me preocupava:
Se minhas plantas eram venenosas ou não.
Imunizações e vacinas então,
eram coisas em que eu não pensava.

Antes de ser mãe,
ninguém vomitou e nem fez xixi em mim,
Nem me beliscou sem nenhum cuidado,
com dedinhos de unhas finas.

Antes de ser mãe,
eu tinha controle sobre a minha mente,
Meus pensamentos, meu corpo e meus sentimentos,
e dormia a noite toda.

Antes de ser mãe, eu nunca tive que
segurar uma criança chorando,
para que médicos pudessem fazer testes
ou aplicar injeções.
Eu nunca chorei olhando pequeninos
olhos que choravam.
Nunca fiquei gloriosamente feliz
com uma simples risadinha.
Nem fiquei sentada horas e horas
olhando um bebê dormindo.

Antes de ser mãe, eu nunca segurei uma criança,
só por não querer afastar meu corpo do dela.
Eu nunca senti meu coração se despedaçar,
quando não pude estancar uma dor.
Nunca imaginei que uma coisinha tão pequenina,
pudesse mudar tanto a minha vida e

que pudesse amar alguém tanto assim.
E não sabia que eu adoraria ser mãe.

Antes de ser mãe, eu não conhecia a sensação,
de ter meu coração fora do meu próprio corpo.
Não conhecia a felicidade de
alimentar um bebê faminto.
Não conhecia esse laço que existe
entre a mãe e a sua criança.
E não imaginava que algo tão pequenino,
pudesse fazer-me sentir tão importante.

Antes de ser mãe, eu nunca me levantei
à noite toda, a cada 10 minutos, para me
certificar de que tudo estava bem.
Nunca pude imaginar o calor, a alegria, o amor,
a dor e a satisfação de ser uma mãe.
Eu não sabia que era capaz de ter
sentimentos tão fortes.

Por tudo e, apesar de tudo, obrigada Deus,
Por eu ser agora um alguém tão frágil
e tão forte ao mesmo tempo.

Obrigada meu Deus, por permitir-me ser Mãe!

Silvia Schmidt

RESUMO

Entre as espécies do gênero *Acinetobacter*, *A. baumannii* tem se destacado como um importante patógeno oportunista, responsável por infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) e surtos hospitalares, particularmente em unidades de tratamento intensivo. Geralmente, esses microrganismos acometem pacientes hospitalizados submetidos a procedimentos invasivos, ou imunodeprimidos. Na última década as cepas de *A. baumannii* tornaram-se rapidamente multirresistentes a diversos agentes antimicrobianos, facilitando a disseminação entre os pacientes e a persistência no ambiente hospitalar por longos períodos. Neste estudo, tivemos como objetivos identificar isolados clínicos de *A. baumannii* oriundos de dois hospitais públicos do Rio de Janeiro utilizando-se métodos convencional e automatizado, além de técnicas moleculares. Foi também verificada a suscetibilidade desses isolados, através de métodos fenotípicos e genotípicos, às drogas antimicrobianas e a um desinfetante à base de compostos quaternários de amônio (QACs). A capacidade de sobrevivência em ambientes escassos de água foi também verificada. Dentre os 94 isolados pertencentes à espécie *A. baumannii*, 89 (94,7%) isolados apresentaram os genes codificadores de oxacilinasas, genes *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-51} e a sequência de inserção *ISAba1*, concomitantemente. Foram verificados 87 (92,6%) isolados de *A. baumannii*, que apresentaram perfil de multirresistência (MDR), representando uma séria preocupação, pois a maioria deles apresentou suscetibilidade apenas às classes de antibióticos polipeptídicos (colistina) e glicilciclina (tigeciclina), e resistência aos carbapenêmicos (imipenem e meropenem), aos β-lactâmicos (penicilinas) e às cefalosporinas. A resistência aos β-lactâmicos também foi examinada fenotipicamente pela produção de enzima metalo-β-lactamases (MBL) através do teste de difusão em discos contendo ceftazidima e ácido 2-mercaptopropiônico. Não foi detectada a produção de MBL em nenhum dos isolados. A análise genotípica e fenotípica da resistência aos QACs, determinou que os isolados de *A. baumannii* mais suscetíveis às drogas antimicrobianas não apresentavam o gene *qacEΔ1*. Em apenas 5 (5%) isolados com perfil MDR o gene *qacEΔ1*, foi detectado. Não foi possível estabelecer uma relação entre a presença desse gene com a suscetibilidade reduzida ao desinfetante. Todos os isolados demonstraram ser sensíveis ao desinfetante utilizado no estudo através do método da Diluição de Uso. Em contra partida foi possível verificar que um isolado que apresentou todas as características fenotípicas e genotípicas de resistência aos antimicrobianos e presença do gene de resistência aos QACs foi capaz de sobreviver até o quadragésimo dia de incubação em condições totalmente adversas, ou seja, em um ambiente totalmente escasso de água. É necessário que uma maior atenção seja direcionada para o controle das IRAS, buscando o uso criterioso de drogas antimicrobianas, antissépticos e desinfetantes, para evitar a seleção, permanência e disseminação de microrganismos resistentes no ambiente hospitalar.

Palavras-chave: 1. *Acinetobacter baumannii*. 2. Antimicrobianos. 3. Desinfetantes. 4. Resistência. 5. Vigilância Sanitária

ABSTRACT

Acinetobacter baumannii has stood out among species from *Acinetobacter* genus as an important opportunistic pathogen, responsible for infections related to health assistance and hospital outbreaks, particularly in intensive care units. Usually, these microorganisms affect hospitalized patients submitted to invasive procedures or the immunosuppressed ones. In the last decade, *A. baumannii* strains fast became multiresistant to many antimicrobial agents, favouring the spread between patients and the persistence in hospital environment for long periods. In this study, the goal was to identify *A. baumannii* clinical isolates originated from two public hospitals from Rio de Janeiro using conventional and automatized methods, besides molecular techniques. Also, antimicrobial drugs and a quaternary ammonium compound (QACs) disinfectant susceptibility of these isolates was investigated using phenotypic and genotypic methods. Survival ability in environments with lack of water was also investigated. Among the ninety-four isolates belonging to *A. baumannii* species, eighty-nine presented oxacillinases codifying genes *bla*_{oxa-23}, *bla*_{oxa-51} and the insertion sequence *ISAbal* at the same time. Eighty-seven (92,6%) *A. baumannii* isolates presenting multiresistant (MDR) profile were detected, representing a serious concern because most of these presented susceptibility only to polipeptidic (colistin) and glycylycylines (tigecycline) and resistance to carbapenems (imipenem and meropenem), to β -lactamics (penicillins) and to cephalosporins. Resistance to β -lactamics was also screened phenotypically through metallo- β -lactamases (MBL) production using disk diffusion test containing ceftazidime and 2-mercaptopropionic acid. MBL production was not detected in none of the isolates. Genotypic and phenotypic analysis of the resistance to QACs demonstrated that *A. baumannii* isolates most susceptible to antimicrobial drugs did not presented *qacE Δ I* gene. In only 5 (5%) isolates presenting MDR profile, *qacE Δ I* gene was detected. It was not possible to establish a relation between the presence of this gene with reduced susceptibility to the disinfectant. All isolates shown to be susceptible to disinfectant used in this study through use dilution method. On the other hand, was observed that an isolate that presented all phenotypic and genotypic antimicrobial resistance characteristics and QACs resistance gene was able to survive until the fortieth day of incubation in total adverse conditions, in other words, in an environment totally lack of water. It is necessary a bigger attention in direction to the control of infections related to health assistance, searching a rational use of antimicrobial drugs, antiseptics and disinfectants, to avoid the selection, remaining and spreading of resistant microorganisms in the hospital environment.

Key-words:1. *Acinetobacter baumannii*. 2. Antimicrobians. 3. Disinfectants. 4. Resistance. 5. Sanitary Surveillance

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Gene *rpoB* e regiões flanqueadoras. As linhas tracejadas delimitam as regiões que identificam as espécies do gênero *Acinetobacter*, as setas os primers **03**
- Figura 2.** Principais mecanismos de resistência aos agentes antimicrobianos em bactérias Gram-negativas **12**
- Figura 3.** Esquema de inserção de um cassete de genes e o mecanismo de expressão de genes associados a um integron classe I **20**
- Figura 4.** Esquema de contaminação dos cilindros de aço inoxidável (carreadores) a partir de culturas estoque de *Staphylococcus aureus* INCQS n.º 00039 - ATCC n.º 6538, *Salmonella choleraesuis* INCQS n.º 00028 - ATCC n.º 10708 e *Pseudomonas aeruginosa* INCQS n.º 00025 - ATCC n.º 15442 **36**
- Figura 5.** Esquema do Método da Diluição de Uso, segundo estabelecido pela *Association of Official Analytical Chemists* – AOAC **37**
- Figura 6.** Número de isolados clínicos identificados como complexo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* durante o período do estudo, que foram coletados nos dois hospitais da rede pública do município do Rio de Janeiro **40**
- Figura 7.** Amplificação da região 1 do gene *rpoB* em isolados identificados como complexo ACB **42**
- Figura 8.** Amplificação dos genes *bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-51}* e sequência de inserção *ISAbal* em isolados de *A. baumannii*, *A. pittii* e *A. nosocomialis* **47**
- Figura 9.** Amplificação do gene *qacEΔ1* em isolados de *A. baumannii* **48**
- Figura 10.** Suscetibilidade dos 94 isolados de *Acinetobacter baumannii* no período de 2010 a 2011 oriundos dos dois hospitais da rede pública do município do Rio de Janeiro **54**
- Figura 11.** Isolado de *Acinetobacter baumannii* negativa para o teste de metalo-β-lactamases (MBL) pelo método de aproximação de discos. **55**

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Identificação bioquímica convencional do complexo *Acinetobacter baumannii* - *calcoaceticus* e as cepas bacterianas utilizadas como controles positivos e negativos das provas bioquímicas **26**
- Tabela 2** Sequências nucleotídicas dos *primers* específicos utilizados na amplificação dos genes *rpoB*, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-51}, *ISAbalA* e *qacEΔ1*. **31**
- Tabela 3** Prevalência de isolados clínicos pertencentes ao complexo *Acinetobacter baumannii* – *calcoaceticus* no período 2010 a 2011 e a distribuição por diferentes sítios de coleta **41**
- Tabela 4** Presença do gene *qacEΔ1* nos isolados *Acinetobacter baumannii* e sua distribuição em diferentes espécimes clínicos **49**
- Tabela 5** Perfil de suscetibilidade dos isolados *A. baumannii* contendo o gene *qacEΔ1* e da cepa de referência ao desinfetante hospitalar obtido através do método da Diluição de Uso e da Concentração Inibitória Mínima (CIM) **58**

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1.** Distribuição das diferentes espécies pertencentes ao complexo *Acinetobacter baumannii* – *calcoaceticus* isoladas de pacientes hospitalizados, de acordo com as fontes de isolamento **43**
- Quadro 2.** Presença dos genes *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-51} e sequência de inserção *ISAba1* nos isolados de *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter pittii* e *Acinetobacter nosocomialis* **44**
- Quadro 3.** Ocorrência simultânea dos genes *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-51} e sequência de inserção *ISAba1* nos isolados de *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter pittii* e *Acinetobacter nosocomialis* **46**
- Quadro 4.** Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados clínicos pertencentes ao complexo *Acinetobacter baumannii* – *calcoaceticus* obtido pelo sistema Vitek 2 **52**
- Quadro 5.** Resumo do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos dos 94 isolados identificados como *Acinetobacter baumannii* durante período do estudo de 2010 a 2011 **53**
- Quadro 6.** Perfil de suscetibilidade aos carbapenêmicos, Concentração Inibitória Mínima e presença de genes de resistência de alguns isolados de *Acinetobacter* **58**

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

2-MPA	Ácido 2 mercaptopropiônico
ACB	Complexo “ <i>Acinetobacter baumannii-calcoaceticus</i> ”
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
AHL	N-acil-homoserina
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AMP	Ampicilina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
ARDRA	<i>Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATM	Aztreonam
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CAZ	Ceftazidima
CF	Cefalotina
CIM	Concentrao Inibitória Mínima
CIP	Ciprofloxacino
CL	Caldo Letheen
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CN	Caldo Nutriente

CS	Colistina
CTX	Cefotaxima
DNA	Ácido desoxiribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DU	Diluição de Uso
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
FEP	Cefepima
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FOX	Cefoxitina
GM	Gentamicina
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IPM	Imipenem
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
LAL	Lisado de Amebócito de <i>Limulus</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MBL	Metalo- β -lactamases
MDR	Multirresistentes
MEM	Meropenem
<i>MFP</i>	<i>Proteína de fusão</i> de membrana
mL	Mililitro

MLST	<i>Multi Locus Sequence Type</i>
mM	Milimoles
NA	Amicacina
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
nM	Nanomoles
n-MDR	não-Multirresistentes
NNISS	<i>National Nosocomial Infection Surveillance System</i>
°C	Graus Celsius
OMPs	<i>Outer Membrane Proteins</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
OXA	Oxacilinase
PAV	Pneumonia associada à ventilação mecânica
pb	pares de bases
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
POP	Procedimento Operacional Padrão
ppm	partes por milhão
PRD	Panresistentes
QAC	Compostos Quaternários de Amônio
rDNA	Ácido desoxirribonucleico ribossômico
RNA	Ácido ribonucleico
RND	<i>Resistance Nodulation Division</i>

SAM	Ampicilina-sulbactam
TBE	<i>Tris-borate-EDTA</i>
TGC	Tigeciclina
TLRs	Receptores do tipo Toll
TSA	Agar Soja Trípica
TSB	Caldo Soja Trípica
TZP	Piperacilina-tazobactam
U	Unidade
UFC	Unidades formadoras de colônia
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo
µg	Micrograma
µL	Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 GÊNERO <i>Acinetobacter</i>	12
1.2 IMPORTÂNCIA CLÍNICA DO GÊNERO <i>Acinetobacter</i> COM ÊNFASE NA ESPÉCIE <i>Acinetobacter baumannii</i>	13
1.3 FATORES DE VIRULÊNCIA E PATOGENICIDADE EM <i>A. baumannii</i>	15
1.3.1 Biofilme	16
1.3.2 <i>Quorum sensing</i>	17
1.3.3 Proteínas de membrana externa (AbOmpA)	18
1.3.4 Lipopolissacarídeos e cápsula exopolissacarídica	18
1.3.5 Síntese de sideróforos	19
1.3.6 Resistência à dessecação	19
1.4 SUSCETIBILIDADE AOS AGENTES ANTIMICROBIANOS	10
1.5 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS AGENTES ANTIMICROBIANOS	11
1.5.1 Enzimas modificadoras de aminoglicosídeos	12
1.5.2 Alteração da permeabilidade da membrana plasmática	13
1.5.3 Sistemas de efluxo	13
1.5.4 β -lactamases	14
1.6 SUSCETIBILIDADE AOS DESINFETANTES À BASE DE COMPOSTOS QUATERNÁRIOS DE AMÔNIO	17
1.7 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	21
2 OBJETIVOS GERAIS	23
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 MICRORGANISMOS	24
3.1.1 Processamento e identificação dos isolados clínicos	25
3.1.2 Manutenção dos isolados	25
3.2 SUSCETIBILIDADE AOS AGENTES ANTIMICROBIANOS	27
3.2.1 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos	27
3.2.2 Teste de detecção fenotípica de metalo- β -lactamases (MBL) a partir de discos de ceftazidima	28

3.3	VERIFICAÇÃO DA PRESENÇA DOS GENES <i>rpoB</i> , <i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-51} , <i>ISAbalA</i> E <i>qacEΔ1</i>	29
3.3.1	Extração do ácido desoxirribonucleico genômico	29
3.3.2	Reação em Cadeia da Polimerase	30
3.4	SEQUENCIAMENTO GENÉTICO	32
3.4.1	Purificação do produto da PCR	32
3.4.2	Determinação das sequências nucleotídicas	32
3.5	SUSCETIBILIDADE AO DESINFETANTE HOSPITALAR À BASE DE QUATERNÁRIO DE AMÔNIO	33
3.5.1	Avaliação da eficácia do desinfetante pelo Método da Diluição de Uso	33
3.5.2	Avaliação da sustentabilidade de <i>A. baumannii</i> ao desinfetante hospitalar	35
3.5.3	Concentração Inibitória Mínima do desinfetante	38
3.7	AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE À DESSECAÇÃO	38
3.7.1	Contaminação de superfícies fixas por <i>A. baumannii</i>	38
3.7.2	Recuperação das células viáveis	39
4	RESULTADOS	40
4.1	IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS	40
4.2	VERIFICAÇÃO DA PRESENÇA DOS GENES <i>rpoB</i> , <i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-51} , <i>ISAbal</i> e <i>qacEΔ1</i>	42
4.2.1	Identificação das espécies do complexo ACB pela amplificação e sequenciamento do gene <i>rpoB</i>	42
4.2.2	Detecção dos genes <i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-51} e <i>ISAbal</i>	44
4.2.3	Detecção do gene <i>qacEΔ1</i>	48
4.3	TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS	49
4.4	TESTE DE DETECÇÃO FENOTÍPICA DE METALO-β-LACTAMASES (MBL) A PARTIR DE DISCOS DE CEFTAZIDIMA	55
4.5	AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO DESINFETANTE PELO MÉTODO DA DILUIÇÃO DE USO	56
4.6	AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE DE <i>A. baumannii</i> AO DESINFETANTE HOSPITALAR	57
4.7	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DO DESINFETANTE	57
4.8	AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE À DESSECAÇÃO	59

5 DISCUSSÃO	60
6 CONCLUSÕES	70
REFERÊNCIAS	72

1 INTRODUÇÃO

Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) constituem um grave problema de saúde pública mundial. Atualmente são consideradas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como “Endemia Surda”, já que são identificadas como o evento adverso de maior frequência durante a prestação de cuidados à saúde; conseqüentemente aumentando a morbidade, a mortalidade dos pacientes, os custos sociais e econômicos para as populações, sistemas de saúde e países. IRAS estão emergindo como um dos maiores desafios para a medicina na atualidade (COELHO et al., 2011).

É notório o crescente número de patógenos Gram-positivos e Gram-negativos causadores de IRAS, antes considerados comensais e pouco importantes para a comunidade científica. Este fato pode ser justificado por diversas razões, dentre todas podem ser citadas duas importantes. Os avanços tecnológicos e científicos das últimas décadas aumentaram o tempo de vida da população, propiciando o surgimento de pacientes com idade avançada, aumentando assim a probabilidade da existência de doenças crônicas, acarretando condições de imunossupressão, adquirida ou induzida associada à vasta prescrição irracional de antimicrobianos, propiciando o desenvolvimento crescente de microrganismos multirresistentes nos últimos anos (MARTINS, 2013).

Em 2008, Rice e colaboradores, denominaram um grupo de seis microrganismos multirresistentes (MMR) de *ESKAPE bugs*, que incluiu: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter*. Estes foram agrupados em função de duas características comuns a todas as espécies, capacidade de sobreviver no meio ambiente em condições adversas e aquisição de diversos mecanismos de resistência a antimicrobianos anteriormente eficazes, dificultando ainda mais o tratamento do paciente.

As espécies do gênero *Acinetobacter*, até 1970 eram consideradas oportunistas comensais de pouca importância clínica, sendo ignoradas quando isoladas em espécimes clínicos (HOUANG et al., 2001). No entanto, tem sido foco de atenção das comunidades médica e científica, após diversos relatos de surtos e fatores de virulência

que permitiram sua sobrevivência e adaptação ao ambiente, mecanismos de resistência a diversos agentes antimicrobianos e tipo de interação estabelecida com o hospedeiro, tornando-se um dos principais patógenos responsáveis por elevada mortalidade e morbidade em unidades de assistência à saúde.

1.1 GÊNERO *Acinetobacter*

O gênero *Acinetobacter* compreende pelo menos 29 espécies oficialmente reconhecidas. É caracterizado por bactérias Gram-negativas, não esporulantes, não fermentadoras da glicose, imóveis, com metabolismo respiratório estritamente aeróbico, catalase-positiva e oxidase-negativa (EUZÉBY, 2013).

As bactérias deste gênero na fase de crescimento exponencial, apresentam forma de bacilos, muitas vezes, em pares ou em cadeias de comprimento variável. Já na fase estacionária, em culturas mais antigas, podem apresentar-se como cocobacilos ou formando filamentos. Em ágar de soja tríptica (TSA) incubados a 30°C, as colônias são convexas, circulares, lisas, translúcidas ou ligeiramente opacas, a maioria mucóides devido à capsula e geralmente sem pigmento. Entretanto, no ágar MacConkey formam colônias de coloração levemente rosa devido à pouca oxidação da lactose (MURRAY, 2007).

Por muito tempo o gênero *Acinetobacter* foi considerado como um representante da família Neisseriaceae, porém atualmente é membro da família Moraxellaceae (ordem das Pseudomonadales, classe das Gammaproteobacteria, filo Proteobacteria e reino Bacteria). As primeiras bactérias deste gênero foram isoladas em 1911 por Beijerinck denominadas de *Micrococcus calco-aceticus*, desde então uma longa história de mudanças propostas por diversos autores definiram uma taxonomia bastante complexa passando por vários gêneros (EUZÉBY, 2013).

O termo *Acinetobacter* foi proposto para o gênero em 1954, por Brisou e Prevout, sendo reconhecido oficialmente em 1971 pelo Subcomitê em Taxonomia de Moraxella, após a publicação dos resultados que avaliaram as características bioquímicas dos microrganismos deste gênero por Baumann e colaboradores (1968).

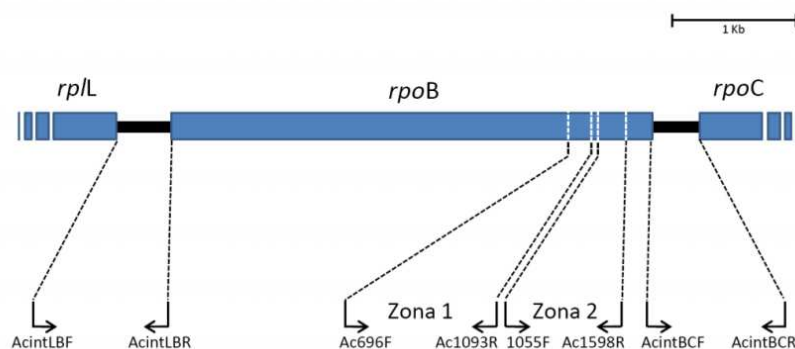
A taxonomia deste gênero ainda está sendo esclarecida por estudos que utilizam técnicas de reassociação de DNA total. É possível também verificar através de estudos filogenéticos, que este gênero é bastante heterogêneo, o que torna ainda mais difícil a separação das espécies por testes fenotípicos (YAMAMOTO; BOUVET; HARAYAMA, 1999, NEMEC et al., 2011).

Isto pode ser observado, em particular, na adoção do termo “complexo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus*” (ACB), para agrupar as genoespécies *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter* genoespécies 3 e *Acinetobacter* genoespécies 13TU, que apresentam semelhanças fenotípica e genotípica entre si.

Entretanto do ponto de vista clínico, esse agrupamento é inadequado, pois uma espécie ambiental (*Acinetobacter calcoaceticus*) é combinada com três espécies clínicas importantes (*Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter* genoespécies 3 e *Acinetobacter* genoespécies 13TU) (GERNER-SMIDT; TJERNBREG, 1993; SEIFERT, 2007).

Segundo La Scola e colaboradores (2006), a análise de um fragmento relativamente pequeno (400 pb) intergênico específico do gene *rpoB*, denominado zona 1 (**Figura 1**), após amplificação por PCR, e sequenciamento, foi capaz de diferenciar/identificar 20 das 24 espécies genômicas existentes, por apresentar menor similaridade entre as espécies envolvidas, sendo considerado um bom marcador molecular da espécie *A. baumannii* (LA SCOLA et al., 2006).

Figura 1. Gene *rpoB* e regiões flanqueadoras. As linhas tracejadas delimitam as regiões que identificam as espécies do gênero *Acinetobacter*, as setas os primers.



Fonte: Ilustração adaptada de LA SCOLA et al., 2006.

Em 2011, Nemec e colaboradores estudaram oitenta cepas pertencentes ao “complexo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus*” (ACB). As cepas foram caracterizadas por análises de *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP), restrição e amplificação de rDNA, testes fenotípicos, sequenciamento dos genes 16S RNA e rpoB e *Multi Locus Sequence Type* (MLST). Os resultados analisados comprovaram que é possível diferenciar individualmente as espécies do complexo ACB. Assim os autores concluíram que, devido à relevância clínica das espécies *Acinetobacter* genomoespécies 3 e *Acinetobacter* genomoespécies 13TU, novas denominações poderiam ser propostas como *Acinetobacter pittii* e *Acinetobacter nosocomialis*, respectivamente.

1.2 IMPORTÂNCIA CLÍNICA DO GÊNERO *Acinetobacter* COM ÊNFASE NA ESPÉCIE *Acinetobacter baumannii*

As espécies de *Acinetobacter* possuem elevada versatilidade nutricional e metabólica, podendo adaptar-se facilmente a diferentes ambientes. Várias delas têm como principal habitat natural o solo, a água, as plantas, a pele saudável dos seres humanos e animais. Em humanos, o gênero faz parte da microbiota normal da pele, frequentemente encontrado em zonas úmidas (virilha, axilas, espaços interdigitais), no trato gastrointestinal (boca, garganta, reto) (BERGOGNE-BÉRÉZIN; TOWNER, 1996).

As espécies isoladas e a importância da colonização diferem entre pacientes hospitalizados e indivíduos saudáveis. Em ambientes hospitalares, algumas espécies foram isoladas de objetos inanimados, tais como equipamentos de Raios-X, bancadas, leitos, ventiladores e sistemas de circulação de ar, assim como isoladas das mãos e de *swabs* nasais do corpo clínico (GIAMARELLOU; ANTONIADOU; KANELLAKOPOULOU, 2008).

Em geral, as espécies mais frequentemente isoladas em pacientes imunocomprometidos foram *A. baumannii*, *A. johnsonii*, *A. lwoffii*, *A. radioresistens*, *Acinetobacter* genomoespécies 3 (*A. pittii*) e *Acinetobacter* genomoespécies 13 (*A. nosocomialis*) (BERGOGNE-BÉRÉZIN; TOWNER, 1996, TOWNER, 1997).

Entre as espécies do gênero, *A. baumannii*, tem se destacado como um importante patógeno oportunista, responsável por IRAS e surtos hospitalares, particularmente em unidades de tratamento intensivo (UTIs). Geralmente acometendo pacientes hospitalizados submetidos a procedimentos invasivos, ou imunodeprimidos, como pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), transplantados e em uso de neoplásicos (LIMA; OLIVEIRA; PAULA, 2008). Em contrapartida, raramente causam infecções comunitárias, já que poucos são os relatos envolvendo casos de pneumonia comunitária causada por *A. baumannii*. Normalmente, os casos de infecções estão associados à comorbidades, como alcoolismo, tabagismo, diabetes e doença pulmonar obstrutiva crônica (FALAGAS et al., 2008).

Em seres humanos, *A. baumannii* pode causar infecções em qualquer órgão, ocasionando meningite, septicemia, endocardite, abscessos (cerebral, pulmonar e da tireóide), infecções secundárias de feridas causadas por trauma ou cirurgia, infecções do trato urinário, porém a manifestação clínica mais comum das infecções é a pneumonia. O fator predisponente mais importante para a pneumonia é a capacidade de aderência destas bactérias às células do epitélio respiratório associada à ventilação mecânica (PAV) em pacientes internados em UTIs, agravando a resposta clínica e aumentando o tempo de internação destes pacientes (LEE et al., 2006).

A. baumannii pode contaminar feridas cirúrgicas e traumáticas, além de causar infecções graves em tecidos conjuntivo, epitelial e muscular. Estas infecções são comuns na presença de próteses (KANAFANI; KANJ, 2008). Durante a guerra do Vietnã, foi o bacilo Gram-negativo mais encontrado em ferimentos traumáticos de extremidades e mais recentemente, durante a Guerra do Iraque de 2003 a 2005, também foram documentados inúmeros casos de osteomielite e infecções de partes moles causados por *Acinetobacter* em soldados americanos e britânicos (DAVIS et al., 2005).

Os doentes com queimaduras graves constituem outro grupo de risco para a colonização e posterior infecção pela espécie. Além da infecção cutânea e dos tecidos moles, os pacientes queimados frequentemente desenvolvem infecções invasivas como bacteremia e pneumonia (DAVIS et al., 2005).

O trato urinário inferior de pacientes hospitalizados pode ser colonizado ou infectado por *A. baumannii*, sobretudo naqueles com cateteres urinários (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

Os recém-nascidos representam outro importante grupo de pacientes de risco para a bacteremia pela espécie. Surtos de septicemia por *A. baumannii* têm ocorrido em UTIs neonatais e aumentos persistentes da incidência de bacteremias por este agente têm sido relatados (KANAFANI; KANJ, 2008; ANURADHA; RATHI; MATHUR, 2013).

O impacto clínico das IRAS causadas por estes patógenos foi rapidamente percebido, pois houve um aumento significativo no tempo de hospitalização destes pacientes e no uso extensivo de agentes antimicrobianos de amplo espectro, pois o maior problema de fato em relação às cepas de *A. baumannii* foi tornarem-se rapidamente multirresistentes a diversos agentes antimicrobianos, tendo como consequência a fácil disseminação entre os pacientes e a persistência no ambiente hospitalar, com difícil erradicação (HOWARD et al., 2012).

1.3 FATORES DE VIRULÊNCIA E PATOGENICIDADE EM *A. baumannii*

Inúmeros fatores de virulência que podem tornar esta espécie patogênica estão sendo intensivamente estudados nos últimos anos, visto que apesar de ser um microrganismo com baixo grau de patogenicidade, pois em indivíduos saudáveis com elevada prevalência de colonização raramente causam patologias, porém podem causar a piora do quadro clínico ou até a morte em indivíduos imunocomprometidos (MARTINS, 2012).

Em um estudo experimental foi observado que uma dose de *A. baumannii*, cerca de 10^6 a 10^8 unidades formadoras de colônias (UFC), administrada por via intraperitoneal em camundongos saudáveis, não resultou em nenhum sinal clínico. Entretanto, a mesma dose aplicada via intratraqueal em camundongos com pneumonia resultou no agravamento do quadro, acarretando pneumonia hemorrágica aguda comparável à pneumonia adquirida em hospitais descrita em países tropicais (ANSTEY et al., 2002).

Entre os vários fatores que podem tornar um microrganismo patogênico, estudos recentes citam para esta espécie alguns fatores que podem ter importante papel nos mecanismos de colonização e patogênese das infecções causadas por *A. baumannii*: a

capacidade de se manter viável por longos períodos em superfícies secas; a capacidade de adquirir nutrientes essenciais, como ferro, em ambientes escassos; produção de enzimas extracelulares com atividades lipolíticas e citolíticas; presença abundante de proteínas de membrana externa (AbOmpA); capacidade de formar biofilmes em superfícies bióticas e abióticas (NUCLEO et al., 2009) e detecção de *quorum sensing* (NIU et al., 2008).

1.3.1 Biofilme

As complexas estruturas denominadas biofilmes, consistem em comunidades multicelulares tridimensionais com células em contato íntimo entre si envoltas em uma matriz composta por polímeros polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos (CHOI et al., 2009).

A aderência das células e produção de biofilmes são processos organizados que respondem a uma grande variedade de estímulos ambientais e de superfície. Estudos relatam que a adesão das células de *A. baumannii* a superfícies abióticas e bióticas é mediada pela ativação de diferentes sistemas, o sistema CsuA/BABCDE que estimula a produção de *pili*, proporcionando assim a aderência das células às superfícies abióticas (LOEHFELM; LUKE; CAMPAGNARI, 2008) e o sistema chaperone Usher Csu, sem formação de *pili*, que proporciona a aderência entre células epiteliais humanas e *A. baumannii* (GADDY; TOMARAS; ACTIS, 2009).

A produção de biofilme por cepas de *A. baumannii* aumenta sua virulência assim como em outras bactérias tais como, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (WROBLEWSKA et al, 2008), diminuindo sua suscetibilidade aos agentes antimicrobianos e favorecendo a sobrevivência sob condições de crescimento desfavoráveis (CHOI et al., 2009).

A formação de biofilmes é especialmente importante em IRAS, pois o uso de cateteres e ventiladores proporcionam superfícies ideais para aderência da bactéria e consequente formação do biofilme, promovendo a colonização e posterior infecção do paciente (DJERIBI, 2012).

1.3.2 *Quorum sensing*

Compreende um sistema de sensoriamento intra e interespecies, mediado por autoindutores, composto por pequenas moléculas que se ligam a proteínas reguladoras de transcrição, ativando/regulando a expressão de alguns genes bacterianos (UROZ; DESSAUX; OGER, 2009). Em bactérias Gram-negativas, as moléculas mediadoras da comunicação celular são denominadas N-acil-homoserina (AHL). Na espécie *A. baumannii*, AHLs são sintetizadas a partir da proteína AbaI, pertence à família de proteínas tipo LuxI e são codificadas pelo gene *abaI* (BHARGAVA; SHARMA; CAPALASH, 2010).

Estudos demonstraram que o fator *quorum sensing* pode regular vários processos metabólicos, incluindo a expressão de genes de virulência, motilidade, esporulação, diferenciação celular, produção de toxinas, transferência plasmidial, bioluminescência e formação de biofilmes (BASSLER, 2005).

1.3.3 Proteínas de membrana externa (AbOmpA)

A proteína de superfície mais abundante na membrana externa de *A. baumannii* é a proteína A (AbOmpA), que liga-se diretamente às células epiteliais e conseqüentemente desencadeia a apoptose destas células através de segmentação mitocondrial. Outro fator importante é o acúmulo de AbOmpA, que aumenta significativamente a quantidade do biofilme formado por *A. baumannii* (CHOI et al., 2008).

1.3.4 Lipopolissacarídeos e cápsula exopolissacarídica

O potencial inflamatório de *A. baumannii* é atribuído a dois fatores: ao lipopolissacarídeo (LPS), uma molécula central no desenvolvimento de septicemia,

responsável pela toxicidade letal em camundongos e pelos resultados positivos no teste do Lisado de Amebócito de *Limulus* (LAL), e pela sinergia dessa molécula com a cápsula exopolissacarídica presente em 30% das cepas de *Acinetobacter*, considerado outro fator de virulência, pois bloqueia o acesso à parede celular microbiana evitando a fagocitose (JOLY-GUILLOU, 2005).

O LPS e a cápsula têm se mostrado potentes indutores de respostas pró-inflamatórias, pois estimulam a produção de citocinas em monócitos humanos, através da ativação do sistema Complemento por vias dependentes de receptores do tipo Toll (TLR-2 e TLR-4). Esta capacidade de estimular respostas inflamatórias em monócitos humanos é provavelmente o fator que mais contribui para a patogênese da infecção (ERRIDGE et al., 2007).

1.3.5 Síntese de sideróforos

O ferro é um fator importante para a sobrevivência de microrganismos tanto no hospedeiro quanto no meio ambiente. *A. baumannii* sob condições de deficiência de ferro, secreta uma variedade de moléculas envolvidas na captação de ferro, incluindo o *acinetobactin*, um sideróforo catecol-hidroxiato que é semelhante ao *anguibactin*, quelante de ferro produzido pelo patógeno de peixes *Vibrio anguillarum* (DORSEY; BEGLIN; ACTIS, 2003).

Atividade de proteínas específicas de *A. baumannii*, orientadas para captação de ferro, pode ser encontrada em soro de indivíduos convalescentes que se recuperaram de bacteremia causada pela mesma espécie (SMITH; ALPAR, 1991). Estas observações sugerem que existe uma grande variabilidade na expressão de moléculas envolvidas na absorção de ferro, mesmo entre cepas isoladas durante o mesmo surto (DORSEY; BEGLIN; ACTIS, 2003).

A secreção de sideróforos é importante, pois favorece o crescimento bacteriano e a expressão de fatores de virulência, entretanto ainda existem alguns aspectos interessantes relacionados com a captação de ferro e sua função na virulência deste patógeno que permanecem desconhecidos (ZIMBLER et al., 2009).

1.3.6 Resistência à dessecação

Além dos fatores de virulência citados acima, as cepas de *Acinetobacter* spp têm características únicas dentre as bactérias Gram-negativas nosocomiais que favorecem sua persistência no ambiente hospitalar. Geralmente, são resistentes à ação de diversos antimicrobianos e biocidas, se propagam facilmente de um paciente para outro, pois são resistentes à dessecação, e deste modo persistem em ambientes secos e inanimados por longos períodos, podendo chegar a 27 dias (ZARRILLI et al., 2004).

A. baumannii resiste melhor à dessecação do que outras espécies como *A. johnsonii*, *A. junii* e *A. lwoffii*. Isto pode explicar por que isolados pertencentes a estas outras espécies são raramente relatados em surtos hospitalares, enquanto *A. baumannii* pode causar surtos epidêmicos prolongados. Há relatos de isolados endêmicos individuais de *A. baumannii* persistindo em hospitais por mais de três anos (JAWAD et al., 1998). Wendt e colaboradores (1997) estudaram a habilidade de diferentes cepas de *Acinetobacter* sobreviverem sob condições adversas, na ausência de água em superfícies típicas do ambiente hospitalar. Algumas cepas foram capazes de sobreviver por vários meses, mais que quatro semanas, sem redução da contagem de colônias, enquanto outras cepas dificilmente sobreviveram nessas condições. As razões para essa variabilidade ainda não são determinadas, mas parecem estar relacionadas a características individuais de cada cepa.

Em um estudo recente foi verificado que a formação de biofilme aumenta a sobrevivência de *A. baumannii* sobre superfícies secas, e que essa relação deve contribuir para a persistência do microrganismo no ambiente hospitalar, aumentando a probabilidade da ocorrência de surtos e infecções nosocomiais (ESPINAL; MARTÍ; VILA, 2012).

1.4 SUSCETIBILIDADE AOS AGENTES ANTIMICROBIANOS

Desde 1970 IRAS causadas por *A. baumannii* são tratadas com os antibióticos: gentamicina, minociclina, ampicilina ou carbenicilina (BERGOGNE-BÉRÉZIN;

TOWNER, 1996). Porém, nos últimos anos os isolados de *A. baumannii* têm apresentado altos índices de resistência (KARLOWSKY et al, 2003), seja por mecanismos intrínsecos ou adquiridos, aos antimicrobianos comumente utilizados como: as penicilinas (benzilpenicilina, ampicilina, ticarcilina e piperacilina), as cefalosporinas (ceftazidima e cefepima), os aminoglicosídeos (amicacina, gentamicina e tobramicina) e as fluorquinolonas (ciprofloxacino) (LEE et al., 2006). Logo, em muitos centros de assistência à saúde, os carbapenêmicos (imipenem e meropenem) tornaram-se a droga de escolha no tratamento dessas infecções (JEON et al., 2005). Entretanto, logo surgiu a prevalência de isolados de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos em hospitais de diferentes regiões geográficas, limitando as opções terapêuticas (POIREL; NORDMANN, 2006).

Pesquisa realizada pelo Programa de Vigilância de Resistência a Antimicrobianos SENTRY avaliou 54.731 cepas Gram-negativas provenientes de isolados clínicos do mundo todo, coletadas de janeiro de 2001 a dezembro de 2004, frente a alguns antimicrobianos, segundo metodologia padronizada pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). A resistência de *Acinetobacter* spp foi de 55% e 52% para ceftazidima e cefepima, respectivamente e de 20% para imipenem. A taxa de resistência para polimixina B variou de 2,7% na Europa, 1,9% na região Ásia-Pacífico e 1,7% nas Américas (GALES; JONES; SADER, 2006).

No Brasil, o Programa SENTRY coletou 3.728 cepas provenientes de quatro estados (São Paulo, Rio de Janeiro, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) no período de 1997 a 1999. A resistência aos carbapenêmicos foi aproximadamente de 10%, à tetraciclina de 35%, à tobramicina 44% e à gentamicina 50%. Cefalosporinas de terceira e quarta geração, e as quinolonas eram ativas contra menos de 40% das cepas (SADER et al., 2001).

A resistência bacteriana aos antibióticos é considerada uma ameaça para a saúde pública, por isso atualmente são realizadas iniciativas nacionais e internacionais, que se focam em estratégias que visam a conscientização da prescrição de antibióticos, minimizando a utilização precoce de uma terapêutica antimicrobiana de largo espectro, reduzindo a seleção de bactérias resistentes e conseqüentemente o número de resistências bacterianas. Assim, torna-se essencial a realização de estudos com isolados oriundos de todo o mundo que verifiquem a suscetibilidade antimicrobiana, favorecendo

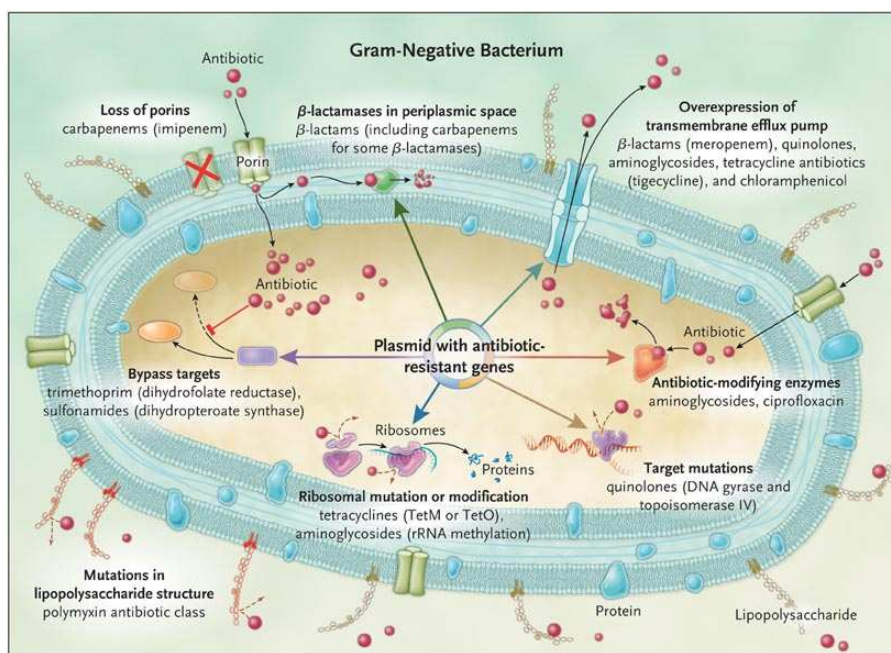
a monitorização e terapêutica dos pacientes e a redução de bactérias multirresistentes (BUTLER et al., 2007).

1.5 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS AGENTES ANTIMICROBIANOS

O interesse em estudar os mecanismos de resistência aos antimicrobianos que cepas de *A. baumannii* têm adquirido nas últimas décadas está intensificado, já que essas bactérias podem acumular múltiplos fatores tornando-se microrganismos multirresistentes (ZAVASCKI et al., 2010)

Os principais mecanismos estudados em *A. baumannii* e envolvidos nessa resistência são: (I) enzimas modificadoras de aminoglicosídeos; (II) impermeabilidade da membrana externa associada à perda ou diminuição na expressão de porinas; (III) hiperexpressão de bombas de efluxo; (IV) produção de enzimas β -lactamases (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008) (**Figura 2**).

Figura 2. Principais mecanismos de resistência aos agentes antimicrobianos em bactérias Gram-negativas.



Fonte: site media vida (<http://www.mediavida.com/>)

1.5.1 Enzimas modificadoras de aminoglicosídeos

As enzimas acetiltransferases, nucleotidiltransferases e fosfotransferases caracterizam suscetibilidade variável para diferentes aminoglicosídeos. Essas enzimas foram encontradas em cepas de *A. baumannii*, sozinhas ou na maioria das vezes em combinação com outras enzimas. Os genes codificadores destas enzimas podem estar localizados em plasmídeos, transposons ou em associação com integrons classe I (SEWARD; LAMBERT; TOWNER, 1998).

Em um estudo de cepas multirresistentes de *A baumannii* isoladas na Europa (n = 105), em 95% das cepas foram encontrados pelo menos um gene de resistência aos aminoglicosídeos e em 84% foram detectados entre dois a cinco genes (NEMEC et al., 2004).

1.5.2 Alteração da permeabilidade da membrana plasmática

Alterações da permeabilidade da membrana podem ocorrer devido a perdas ou diminuição da expressão de proteínas de membrana externa, as porinas (OMPs – “*outer membrane proteins*”) que agem como canais de entrada transportando moléculas através da membrana externa para o interior da célula bacteriana (ZAVASCKY et al., 2010).

Cepas de *A. baumannii* têm relativamente poucas porinas quando comparadas a outras bactérias Gram-negativas, o que pode explicar em parte sua resistência antimicrobiana intrínseca (SATO; NAKAE, 1991, CATEL-FERREIRA et al., 2011).

A principal OMP de *A. baumannii* é uma proteína monomérica, nomeada OmpAb ou HMP-AB (“*Heat-modifiable protein*”), pertencente à família OmpA-like. A perda da proteína OMP de 29KDa, denominada CarO, pode estar associada à resistência aos carbapenêmicos (CATEL-FERREIRA et al., 2011).

1.5.3 Sistemas de efluxo

A eliminação de fármacos, por mecanismos de sistemas de efluxo contribui substancialmente para a resistência a diversos antimicrobianos. Sistemas de efluxo da família *Resistance Nodulation Division* (RND) são compostas por três estruturas com, uma bomba de efluxo, situada na membrana interna ou citoplasmática, uma proteína formadora do canal extrusor na membrana externa (OMP) e uma proteína de fusão de membrana (MFP) que liga estes dois componentes. Dois destes sistemas já foram caracterizados em *A.baumannii*, AdeABC e AdeIJK. Foi constatado que devido à super expressão de AdeABC, as cepas tornaram-se resistentes aos aminoglicosídeos, à eritromicina, aos β -lactâmicos, ao cloranfenicol e à tetraciclina (DAMIER-PIOLLE et al., 2008).

1.5.4 β -lactamases

Um dos principais mecanismos de resistência do gênero *Acinetobacter* aos antimicrobianos, principalmente aos carbapenêmicos está relacionado às enzimas β -lactamases, que catalisam a hidrólise do anel beta-lactâmico pela quebra da ligação amida, perdendo assim, a capacidade de inibir a síntese da parede celular bacteriana (WILLIAMS, 1999). Embora, todas as β -lactamases catalisem a mesma reação, existem alguns esquemas de classificações propostos para estas enzimas, segundo a estrutura primária (classe A a D) e as características funcionais e bioquímicas (grupo I a IV). Na classificação molecular, segundo Ambler (1980), baseada na homologia da sequência dos aminoácidos, quatro classes foram designadas A, B, C e D. As β -lactamases da classe A, C e D possuem um resíduo de serina no sítio ativo e atuam sobre o antibiótico hidrolisando o anel β -lactâmico inativando-o, enquanto as enzimas da classe B, também denominadas metalo- β -lactamases (MBL), utilizam cátions divalentes, geralmente íons de zinco como cofator para sua atividade catalítica (LIVERMORE, 1995).

As β -lactamases podem ser encontradas extracelularmente em bactérias Gram-positivas, ou no espaço periplasmático em bactérias Gram-negativas. Os genes que

codificam a produção destas enzimas podem estar localizados no cromossomo bacteriano ou em plasmídeos (BUSH, 1988). Diversas destas enzimas já foram descritas em *Acinetobacter*, porém as classes B e D apresentam maior frequência e atividade hidrolítica sobre os carbapenêmicos, sendo denominadas também como carbapenemases (POIREL; NORDMANN, 2002).

Carbapenemases classe B ou MBL conferem alto nível de resistência aos carbapenêmicos e a todos os outros β -lactâmicos, com exceção de monobactâmicos (aztreonam), e são inibidas por agentes quelantes como ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e ácido mercaptopropiônico. Podem ser codificadas por cassetes gênicos localizados no cromossomo ou plasmídio bacteriano. No entanto, com exceção da enzima SPM-1, que é codificada por um gene localizado em plasmídio, as demais MBL adquiridas podem ser codificadas por genes localizados em integrons de classe 1, que são elementos genéticos localizados em regiões conservadas, que podem conter um ou mais cassetes de genes em posições específicas (MENDES et al., 2004).

A produção de MBLs por *Acinetobacter* tem sido reportada em isolados de todo mundo, sendo que das nove subclasses de MBL atualmente conhecidas, três já foram descritas em *A. baumannii*: IMP, VIM e SIM-1. A primeira MBL, SIM-1, codificada pelo gene *bla_{SIM-1}* foi detectada em sete cepas de *A. baumannii* isoladas de um hospital terciário em Seul, Coreia (LEE et al., 2005). As variantes pertencentes à subclasse IMP parecem ser mais prevalentes na Ásia, embora no Brasil já tenha sido identificada uma cepa de *A. baumannii* produzindo IMP-6 (GALES et al., 2003). *Acinetobacter* spp produtor de VIM foi detectado inicialmente na Coreia e na Alemanha (LEE et al., 2003, TOLEMAN; JONES; WALSH, 2004, WALSH et al., 2005).

Outro grupo de carbapenemases são as β -lactamases da classe D, também denominadas de oxacilinases (OXA) possuem alta atividade hidrolítica contra cloxacilina e preferencialmente por oxacilina (BRADFORD, 2001). Por apresentarem uma grande variabilidade genotípica, Sanschagrín, Couture e Levesque (1995) classificaram a série OXA em cinco grupos de acordo com a similaridade genética (grupos I a V). A maioria destas enzimas confere resistência a cefepima, aztreonam e principalmente aos carbapenêmicos, sendo inibidas pelo ácido clavulônico e não dependem de zinco como cofator (POIREL; NORDMANN, 2002). Até o momento, cinco desses subgrupos filogenéticos já foram descritos em *A. baumannii*, OXA-23-like,

OXA-24-like, OXA-51-like, OXA-58-like, OXA-143-like (POIREL; NORDMANN, 2010).

Oxacilinasas OXA 51 podem ser identificadas na maioria dos isolados de *Acinetobacter*, sendo intrínsecas ao gênero. Como a oxacilinase OXA-51 se constituía numa das variantes mais encontradas em *A. baumannii*, e como esta característica parecia ser ubíqua do gene *bla_{OXA-51}* nestas cepas, tornou esse gene um importante marcador genético para identificação do microrganismo a nível de espécie (TURTON et al., 2006a). Entretanto, em 2011, Nemec e colaboradores detectaram o gene *bla_{OXA-51}* em outras espécies do gênero *Acinetobacter*. Estas enzimas têm baixa capacidade de hidrolisar as penicilinas (benzilpenicillina, ampicillina, ticarcillina e piperacillina) e os carbapenêmicos (imipenem e meropenem), e não são ativas contra cefalosporinas (HÉRITIER et al., 2005). Estudos verificaram que existe um forte promotor transcricional, sequências de inserção, que contribui significativamente para que as cepas que apresentem a enzimas OXA-51 possuam alto nível de resistência aos carbapenêmicos (TURTON et al., 2006b). Diversas sequências de inserção têm sido descritas em *Acinetobacter*, sendo que a sequência *ISAbal* parece ser prevalente na espécie *A. baumannii*, pois já foi detectada em 80% das 50 cepas isoladas em 20 países do mundo (MUGNIER et al., 2009).

As oxacilinasas que conferem resistência aos carbapenêmicos encontradas em cepas de *A. baumannii* isoladas na maioria das regiões do mundo, são as oxacilinasas codificadas por genes *bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-40}* e *bla_{OXA-58}*, que podem estar localizados em plasmídeos ou no cromossoma (POIREL; NORDMANN, 2006). A primeira cepa de *A. baumannii* que apresentou resistência ao imipenem, às penicilinas e às cefalosporinas foi isolada em 1985 na Escócia (PATON et al., 1993). Inicialmente a enzima foi chamada de *Acinetobacter resistant imipenem* (ARI-1), mas em 2000 foi realizado seu sequenciamento, que demonstrou 36% de identidade com as enzimas OXA-5 e OXA-10, sendo renomeada para OXA-23 (DONALD et al., 2000).

As cepas de *A. baumannii* produtoras de oxacilinasas tipo OXA-23, estão se disseminando rapidamente e têm sido descritos surtos hospitalares em diversos países do mundo como Argentina, Brasil, Cuba, França, Hong Kong, Itália, Japão, Kuwait, Cingapura, China e Espanha (MUGNIER et al., 2010). No Brasil, o primeiro relato de oxacilinase OXA-23 em *A. baumannii* foi descrito em Curitiba em 2003. Neste estudo, foram analisadas oito cepas de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos, sendo a

presença desta enzima detectada em todas elas (DALLA-COSTA et al., 2003). Outro estudo realizado na cidade de Porto Alegre em 2007 investigou os mecanismos de resistência aos carbapenêmicos em cepas de *A. baumannii* multirresistentes. Foram analisadas 53 cepas de *A. baumannii* resistentes ao imipenem e ao meropenem de pacientes internados em dois hospitais de Porto Alegre. Todas essas cepas eram positivas para o gene *bla_{OXA-23}* e negativas para o gene *bla_{OXA-58}* (MARTINS et al., 2009).

Diversos estudos de mecanismos de resistência a antibióticos em *Acinetobacter baumannii* têm demonstrado a presença de genes específicos localizados em plasmídeos e transposons. Nos últimos anos, vários mecanismos de disseminação de resistência gênica em bactérias têm sido descritos. Estes mecanismos se baseiam na localização dos genes de resistência em integrons (SEWARD; LAMBERT; TOWNER, 1998), tornando-se um desenvolvimento preocupante para a quimioterapia antimicrobiana (CARVALHO et al., 2009).

1.6 SUSCETIBILIDADE AOS DESINFETANTES À BASE DE COMPOSTOS QUATERNÁRIOS DE AMÔNIO

Os mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos, antissépticos e desinfetantes representam um desafio para a Saúde Pública. Embora diversos estudos estejam voltados para a detecção de genes que conferem aos microrganismos resistência aos antibióticos, deve haver não só uma preocupação com o uso indiscriminado e impróprio das drogas antimicrobianas, mas também com o uso incorreto de antissépticos e de desinfetantes, uma vez que a presença de genes com resistência a desinfetante pode levar à seleção de bactérias resistentes a drogas antimicrobianas e vice-versa durante desinfecção ou antibioticoterapia em hospitais (SIDHU et al., 2002).

Antissépticos e desinfetantes à base de compostos quaternários de amônio (QAC), como cloreto de benzalcônio, cloreto de cetilpiridinium, cetrimida, proceína e **detizor**, são recomendados para sanitização frequente do meio hospitalar, como superfícies não críticas, chão, móveis e paredes em hospitais e em outras unidades de saúde para prevenir a disseminação de patógenos. São agentes de superfície catiônicos

com ação antimicrobiana, os quais podem desnaturar proteínas, inativar enzimas e, conseqüentemente, causar inibição de reações metabólicas (como a de produção de energia) e alterar a permeabilidade da membrana citoplasmática (MERIANOS, 2001). Uma característica apresentada pelos QAC é serem efetivos para bactérias Gram-positivas, e menos efetivos para bactérias Gram-negativas, especialmente *P. aeruginosa*, além de serem ativos para alguns fungos e vírus não lipídicos. Entretanto não possuem ação letal contra endósporos, micobactérias ou vírus hidrofílicos (ROMÃO, 1996).

Casos de resistência intrínseca e adquirida aos QAC têm sido descritos, principalmente entre espécies de bactérias Gram-negativas (McDONNELL; RUSSELL, 1999). Porém o aparecimento de isolados de *S. aureus* resistentes ao cloreto de benzalcônio já foi demonstrado (AL-MASAUDI, DAY; RUSSEL, 1988). Um estudo verificou que o uso de concentrações subletais deste produto poderia levar ao desenvolvimento de resistência cruzada e induziria o efluxo do desinfetante pelos estafilococos (HEIR, SUNDHEIM; HOLCK, 1999). A co-resistência entre diferentes desinfetantes e drogas antimicrobianas foi encontrada também em bactérias Gram-negativas (STICKLER; THOMAS, 1980), mas o mesmo não foi observado em um estudo mais recente sobre *P. aeruginosa* (ROMÃO et al., 2005).

Dentre os diversos mecanismos de resistência bacteriana aos biocidas, podem ser destacados: (I) mecanismo de resistência intrínseca, em casos de bactérias formadoras de biofilme (McDONNELL; RUSSELL, 1999), o qual é também um determinante da resistência bacteriana às drogas antimicrobianas; (II) produção de bombas de efluxo, que são proteínas transportadoras, dependentes da força próton motora, que diminuem a concentração intracelular de antibióticos, antissépticos e desinfetantes, excretando-os para fora da célula, tornando o microrganismo menos suscetível aos mesmos (KÜCKEN; FEUCHT; KAULFERS, 2000); (III) mutação celular ou por aquisição de elementos genéticos móveis de DNA, que codificam enzimas e outras proteínas que promovem a movimentação do DNA dentro de genomas (mobilidade intracelular) ou entre bactérias (mobilidade intercelular). Assim, a mobilidade genética pode levar à disseminação epidêmica da resistência às diferentes classes de antibióticos, antissépticos e desinfetantes entre espécies (McDONNELL; RUSSELL, 1999).

Um dos mecanismos de resistência aos desinfetantes é aquisição de Integrons, que são famílias de elementos genéticos móveis, capazes de integrar e expressar genes

de resistência a antibióticos e desinfetantes. São compostos por duas sequências conservadas (5'CS e 3'CS) e por uma região variável.

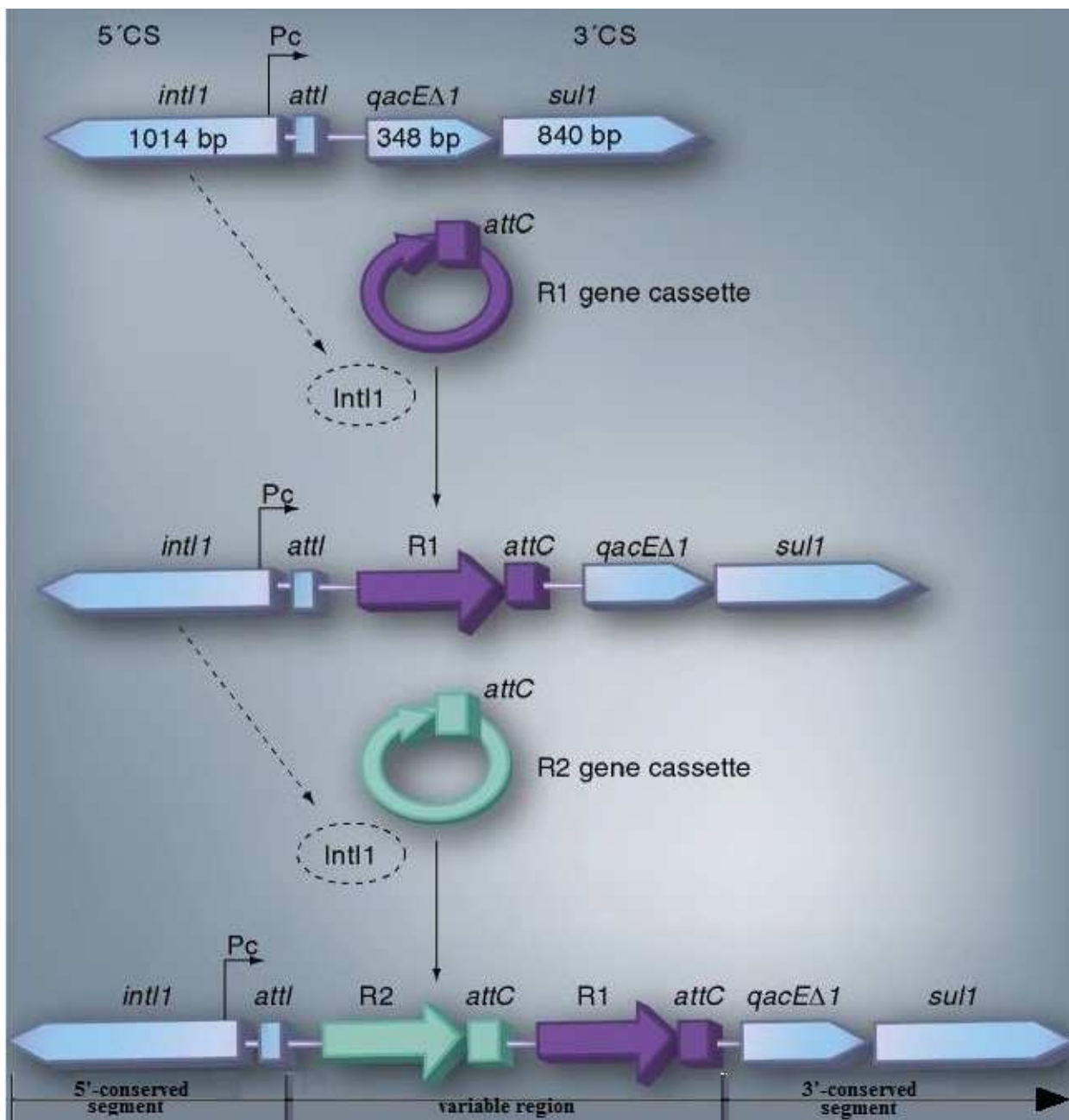
A primeira região conservada (5'CS) é constituída pelo gene *intl* que codifica a enzima integrase, e o gene *attI*, local que permite a recombinação do integron com cassetes de genes. Entre o gene *intl* e o gene *attI*, encontram-se os promotores divergentes *P_I* para expressão da integrase e o promotor *P_C* para expressão dos cassetes de genes inseridos na região variável (BENNETT, 1999).

A região variável do integron é composta por cassetes gênicos (CG), que são pequenos elementos circulares de DNA com uma região codificante que, em geral nos microrganismos Gram-negativos estão presentes muitos dos genes que conferem resistência aos antibióticos (RECCHIA; HALL, 1995).

Na segunda região conservada (3'CS) estão presentes os genes que conferem, respectivamente, resistência aos desinfetantes à base de compostos quaternários de amônio (gene *qacEAI*, considerado uma versão defectiva do gene *qacE*, que também codifica resistência aos QAC) e às sulfonamidas (gene *sulI*). Cinco classes de integrons foram identificadas, porém em integrons classe 1, estes dois genes encontram-se amplamente difundidos e são frequentemente detectados em bactéria Gram-negativas, facilitando a disseminação destas bactérias no ambiente hospitalar e dificultando ainda mais a erradicação (WALSH et al., 2005) (**Figura 3**).

Isto indica que é essencial a aplicação da concentração adequada do produto diluído, do tempo de contato do produto e da limpeza da superfície anterior à desinfecção, o que certamente dependeria de um excelente treinamento (ROMÃO, 1996, COZAD; JONES, 2003). Portanto, deve haver não só uma preocupação com o uso indiscriminado e impróprio das drogas antimicrobianas, mas também com o uso incorreto de antissépticos e de desinfetantes, já que a ausência destas atitudes impõe uma forte pressão seletiva, gerando um número cada vez maior de bactérias resistentes a tais agentes. Reforçando a necessidade de sempre incentivar medidas que previnam as infecções cruzadas como cuidados básicos, de sempre lavar as mãos com água e sabão e fazer o uso de álcool gel após cada lavagem.

Figura 3. Esquema de inserção de cassetes de genes e o mecanismo de expressão de genes associados a um integron classe I.



Fonte: HARBOTTLE et al., 2006.

1.7 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

O Sistema de Saúde é constantemente desafiado por IRAS, que constituem grave problema de saúde pública mundial, aumentando a morbidade e a mortalidade entre os pacientes, e consequentemente a duração do tratamento da doença e elevação dos custos hospitalares (DAI et al, 2010).

Em 2003, segundo o sistema americano de vigilância das infecções nosocomiais *National Nosocomial Infection Surveillance System* (NNISS), *Acinetobacter* foi responsável por cerca de 2,4% das bacteremias nas UTIs, sendo o segundo Gram-negativo mais encontrado. Entre 1986 e 2003 os dados deste mesmo instituto descreveram um aumento significativo na proporção de pneumonias causadas por *Acinetobacter*, que passou de 4% em 1986 para 7% em 2003 (GAYNES; EDWARDS, 2005).

Os surtos de IRAS ocorridos recentemente no Brasil demonstram uma alteração alarmante no perfil dos agentes etiológicos responsáveis pelos mesmos. Dados brasileiros fornecidos pelo SENTRY indicam que de 1997 a 1999, *Acinetobacter* foi o quinto Gram-negativo mais prevalente, responsável por 6,7% de todas as infecções, isolado em 10,8% das pneumonias (terceiro agente causador de pneumonia nosocomial), em 6,8% das infecções da corrente sanguínea, 2,8% das infecções de sítio cirúrgico e 3% das infecções do trato urinário (SADER et al., 2001).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) tem publicado informativos e boletins em seu sítio eletrônico visando a contenção dessa disseminação, além de manter um projeto de “Monitoramento e Prevenção da Resistência Antimicrobiana em Serviços de Saúde”. Nesse projeto, foram realizadas diversas atividades como: capacitação dos profissionais de laboratório das instituições hospitalares componentes da Rede; seminários de gerenciamento de informação sobre resistência bacteriana; notificação dos dados referentes à resistência microbiana que são divulgados por meio de boletim eletrônico; cooperação internacional com a Rede de Monitoramento da Resistência da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) e da OMS; publicação de manual técnico sobre interpretação de resultados microbiológicos para auxiliar na prescrição racional de antimicrobianos; realização de seminários nacionais com periodicidade para discussão da emergência e controle da disseminação

da resistência microbiana no país; entre outros. Embora esse projeto da Anvisa ainda esteja em fase de aperfeiçoamento, os dados por ela divulgados são valiosos para alertar os profissionais da saúde e a população sobre a necessidade da adoção de medidas de prevenção e controle da resistência dos microrganismos às drogas antimicrobianas.

Nos últimos anos *A. baumannii* tem se tornado uma das principais causas das IRAS em todo o mundo, inclusive no Brasil, devido à sua notável capacidade de aquisição de fatores de resistência a uma ampla variedade de agentes antimicrobianos e dificuldade de erradicação durante a desinfecção ou antibioticoterapia em hospitais.

Ainda assim, a ausência de estudos que investigam a correlação entre a suscetibilidade desta espécie aos antimicrobianos e aos desinfetantes usados normalmente em ambientes hospitalares tem corroborado com a disseminação indiscriminada de microrganismos resistentes impondo uma forte pressão seletiva e consequentemente gerando um número cada vez maior de bactérias resistentes a drogas antimicrobianas e/ou biocidas.

Para solucionar este problema de saúde pública é de fundamental importância que haja um grande investimento no Sistema Único de Saúde (SUS), em insumos, capacitação e envolvimento direto dos profissionais de saúde, assim como fomentar estudos estratégicos, para que sejam gerados dados voltados à realidade da população brasileira que ajudem a estabelecer ferramentas que promovam o controle destas infecções. Desta forma estudos sobre o tema é de especial relevância à saúde pública.

2 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo do presente trabalho foi realizar um amplo estudo envolvendo isolados clínicos de *Acinetobacter* provenientes de dois hospitais públicos do Rio de Janeiro. Visando verificar a diversidade dos genes que conferem resistência aos antimicrobianos e a desinfetantes hospitalares, além da caracterização fenotípica e a avaliação da suscetibilidade às drogas antimicrobianas e ao biocida.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar os isolados clínicos de *Acinetobacter* oriundos de dois hospitais do município do Rio de Janeiro;
- Verificar o perfil de suscetibilidade dos isolados frente a diferentes antimicrobianos;
- Verificar a existência de genes específico da espécie, gene *rpoB*, e de resistência a agentes antimicrobianos, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-23} e *ISAbalA*;
- Verificar a existência de gene *qacEΔ1*, associado à resistência a desinfetantes à base de quaternário de amônio;
- Sequenciar os genes *rpoB* e *qacEΔ1* detectados nos isolados analisados;
- Realizar a detecção fenotípica de beta-lactamases em isolados de *A. baumannii* resistentes ao meropenem e ao imipenem;
- Avaliar a suscetibilidade de *A. baumannii* a um desinfetante hospitalar à base de quaternário de amônio através das técnicas da Concentração Inibitória Mínima e da Diluição de Uso;
- Analisar a suscetibilidade de *A. baumannii* à dessecação.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MICRORGANISMOS

Foram utilizados 100 isolados clínicos pertencentes ao complexo *Acinetobacter baumannii* – *calcoaceticus*, coletados de pacientes hospitalizados em dois hospitais da rede pública do município do Rio de Janeiro, no período compreendido entre abril de 2010 a abril de 2011.

As seguintes cepas de microrganismos foram utilizadas como controles dos procedimentos realizados neste estudo:

- *Acinetobacter baumannii* INCQS n.º 00143 (ATCC 19606); *Escherichia coli* INCQS n.º 00033 (ATCC 25922); *Staphylococcus aureus* INCQS n.º 00015 (ATCC 25923); *Pseudomonas aeruginosa* INCQS n.º 00099 (ATCC 27853); *Klebsiella pneumoniae* ATCC® 13883; *Aeromonas hydrophila* ATCC® 7965; *Streptococcus* spp; *Salmonella* spp → usadas como controle positivo e/ou negativo nas provas bioquímicas convencionais;
- *Staphylococcus aureus* INCQS n.º 00039 (ATCC 6538) → cepa utilizada em ensaios de avaliação da atividade antimicrobiana de desinfetantes;
- *Salmonella choleraesuis* INCQS n.º 00028 (ATCC 10708) → cepa utilizada em ensaios de avaliação da atividade antimicrobiana de desinfetantes e avaliação da suscetibilidade a dessecação;
- *Pseudomonas aeruginosa* INCQS n.º 00025 (ATCC 15442) → cepa utilizada em ensaios de avaliação da atividade antimicrobiana de desinfetantes.
- *Pseudomonas aeruginosa* VIM-1, *Pseudomonas aeruginosa* IMP-1 e *Acinetobacter baumannii* SIM -1 → as cepas foram gentilmente cedidas pela Dra. Ana C. Gales do Laboratório Alerta, Disciplina de Infectologia da Universidade Federal de São Paulo e utilizadas como controles positivos nos experimentos de detecção fenotípica de metalo-β-lactamases (MBL).

3.1.1 Processamento e identificação dos isolados clínicos

No laboratório, as culturas foram submetidas a novo cultivo para verificação da pureza. As bactérias foram cultivadas em caldo soja tríptica (TSB) por 24 h à temperatura de 37°C. Em seguida foi realizado o isolamento da cultura em placa de Petri contendo ágar soja tríptica (TSA) pela técnica de esgotamento. Após a incubação por 24 h a 37°C, uma colônia totalmente isolada foi inicialmente submetida à coloração de Gram e estriada em tubo contendo TSA inclinado, incubado nas mesmas condições anteriores. Em seguida, foram realizadas provas bioquímicas convencionais relevantes para a identificação do complexo *Acinetobacter baumannii* – *calcoaceticus*, com os seguintes testes: citrato (Simmons), hidrólise da esculina, crescimento a 42°C em caldo Brain Heart Infusion (BHI), **Oxidação-Fermentação** glicose, citocromo oxidase, mobilidade, indol, catalase, ágar cetrimida e MacConkey (MURRAY, 2007).

Após a realização da série bioquímica convencional, foram selecionados os isolados clínicos pertencentes ao complexo *Acinetobacter baumannii* – *calcoaceticus*. Na **Tabela 1**, são apresentados os resultados esperados para as provas bioquímicas convencionais relevantes para a identificação do complexo *Acinetobacter baumannii* – *calcoaceticus*.

Após a identificação convencional realizou-se também a identificação automatizada por meio do sistema Vitek 2 (BioMérieux Vitek Systems Inc., Hazelwood, MO) utilizando o cartão para identificação de Gram-negativos (GN, referência 21341), seguindo-se as orientações do fabricante.

Tabela 1

Identificação bioquímica convencional do complexo *Acinetobacter baumannii* - *calcoaceticus* e as cepas bacterianas utilizadas como controles positivos e negativos das provas bioquímicas.

Testes	Complexo <i>A. baumannii</i> - <i>calcoaceticus</i>	Controle Positivo	Controle Negativo
Coloração de Gram	Cocobacilos Gram-negativos	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922
Citrato (Simmons)	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC® 13883	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922
Hidrólise da esculina	-	<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC® 7965	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853
Crescimento a 42°C (BHI)	+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853	
OF glicose	+ (oxidativo)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922
Citocromo oxidase	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853	<i>A. baumannii</i> ATCC® 19606
Produção de H ₂ S	-	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25923	<i>Streptococcus</i> spp
Índol	-	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25923	<i>Salmonella</i> spp
Mobilidade	-	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25923	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923
Catalase	+	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	<i>Streptococcus</i> spp
Ágar cetrimida	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853	<i>A. baumannii</i> ATCC® 19606
Ágar MacConkey	+	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25923	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923

(+) = positivo; (-) = negativo

3.1.2 Manutenção dos isolados

Todos os isolados clínicos identificados como pertencentes ao complexo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* foram estocados em caldo BHI (Difco), contendo 20% de glicerol (v/v) e mantidos em *freezer* a -20°C e -70°C.

3.2 SUSCETIBILIDADE AOS AGENTES ANTIMICROBIANOS

3.2.1 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos

Os testes foram realizados através do sistema automatizado Vitek 2 usando-se o cartão para suscetibilidade de Gram-negativos aeróbios com significado clínico (GN-105) (BioMérieux), de acordo com as instruções do fabricante. O cartão contém os seguintes antimicrobianos: AMP-ampicilina, SAM-ampicilina-sulbactam, TZP-piperacilina-tazobactam, CF-cefalotina, FOX-cefoxitina, CTX-cefotaxima, CAZ-ceftazidima, FEP-cefepima, ATM-aztreonam, IPM-imipenem, MEM-meropenem, NA-amicacina, GM-gentamicina, CIP-ciprofloxacino, TGC-tigeciclina, CS-colistina. O inóculo bacteriano inserido em cada cartão correspondeu à turvação de 0,5 da escala de McFarland.

Os isolados foram classificados, segundo critérios de Maragakis e Perl (2008), em não-multirresistentes (n-MDR), multirresistentes (MDR) e panresistentes (PRD). Foram considerados multirresistentes, os isolados que apresentaram resistência a três ou mais classes dos seguintes agentes antimicrobianos: aminoglicosídeos, penicilinas antipseudomonas, carbapenêmicos, cefalosporinas, fluorquinolonas, colistina, ampicilina-sulbactam e tetraciclinas. A classificação panresistente (PDR) foi designada aos isolados que apresentaram resistência a todas as classes de antimicrobianos testados.

3.2.2 Teste de detecção fenotípica de metalo- β -lactamases (MBL) a partir de discos de ceftazidima

Para detecção fenotípica de MBL foram utilizados apenas os isolados que apresentaram resistência ao imipenem e ao meropenem. A partir da cultura obtida em placa de Petri contendo TSA, incubada por 18 a 24 h a 37°C foram escolhidas colônias bacterianas isoladas, sendo preparada uma suspensão em solução de cloreto de sódio (0,85%) correspondente ao padrão 0,5 da escala de McFarland. O inóculo bacteriano foi semeado em placas de Petri contendo ágar Müeller-Hinton, seguindo o mesmo procedimento padronizado para disco difusão (CLSI, 2011). Dois discos de ceftazidima (CAZ, 30 μ g) foram colocados na placa a uma distância de 4 a 5 cm. Um disco de papel de filtro (disco branco), ao qual foi adicionado 3 μ L de uma solução pura de ácido 2 mercaptopropiônico (2-MPA), foi colocado a 2,5 cm (centro a centro) de um dos discos de CAZ, e as placas foram incubadas a 35°C por 18-24 h (ARAKAWA et al., 2000).

O aumento da zona de inibição na área entre o disco de 2-MPA e o disco de CAZ em comparação com a zona de inibição do disco de CAZ foi interpretado como resultado positivo (YAN et al., 2004). Enquanto, a área inalterada entre os halos de inibição de crescimento da bactéria foi interpretada como resultado negativo. O disco de CAZ afastado dos demais foi utilizado para visualização da inibição sem influência dos inibidores da enzima.

3.3 VERIFICAÇÃO DA PRESENÇA DOS GENES *rpoB*, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-51}, *ISAbalA* e *qacEΔ1*

3.3.1 Extração do ácido desoxirribonucleico genômico

Os isolados identificados como pertencentes ao complexo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* foram semeados em TSB e incubados por 24 h a 37°C. Após crescimento, 1000 µL foram transferidos para um microtubo o qual foi centrifugado. O sedimento foi suspenso em tampão de lise (20 mM de Tris, 2 mM de EDTA tetrassódico e 1,2% de Triton X 100) contendo 36 µL de lisozima (50 mg/mL) para a lise das estruturas externas bacterianas. O DNA genômico foi extraído utilizando-se o kit Dneasy Tissue Kit (Qiagen, Inc, Valencia, CA), de acordo com as recomendações do fabricante.

Em seguida, a presença do material genético foi verificada em gel de agarose 0,8%, em tampão TBE 1,0 X (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2,5 mM, pH 8,3). Uma alíquota de 4µL de DNA adicionada de 3 µL de tampão de carregamento (*loading buffer*) foi aplicada no gel, assim como uma amostra de DNA contendo fragmentos de tamanhos conhecidos (100 bp DNALadder - LGC Biotecnologia). A eletroforese em gel de agarose ocorreu em uma cuba horizontal contendo tampão TBE 1X adicionado de brometo de etídio (0,5µg/mL), durante 1h. O material genético foi visualizado e documentado por meio de um sistema de documentação de géis (ImageQuant 300).

3.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase

Para a técnica da *Polimerase Chain Reaction* (PCR) foram usados oligonucleotídeos (*primers*) específicos para amplificar os genes *rpoB*, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-51}, *ISAbalA* e *qacEAI*. O aparelho utilizado para a realização das reações foi o termociclador DNA PTC-200-Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Massachusetts, EUA).

A análise em particular do gene *rpoB*, foi conduzida com a finalidade de diferenciar/identificar as espécies pertencentes ao complexo ACB segundo La Scola e colaboradores (2006).

Para os genes *bla*_{OXA-23} e *bla*_{OXA-51} foram utilizados pares de oligonucleotídeos citados por Zong e colaboradores (2008). O gene *ISAbalA* foi amplificado a partir da sequência de oligonucleotídeos descrita por Mugnier e colaboradores (2009). A sequência do gene *qacEAI* foi descrita por Romão e colaboradores (2011) (**Tabela 2**).

A reação de amplificação do gene *rpoB* foi realizada em um volume final de 25 µL contendo 2 µL de DNA adicionados de tampão Taq DNA polimerase (1x), cloreto de magnésio (1,5 mM), dNTP (0,2 mM), oligonucleotídeos (0,2 µM), Taq DNA polimerase (2.5 U/ µL) e água MILLI-Q estéril para completar o volume final da reação. A amplificação foi realizada sob as seguintes condições de ciclagem: 94°C por 2 minutos; 94°C por 30 segundos, temperatura de anelamento a 52°C durante 30 segundos, 72°C por 60 segundos (35 vezes a partir da segunda etapa), uma elongação final a 72°C por 7 minutos. Os produtos da PCR foram mantidos a 4°C até a utilização (La SCOLA et al., 2006).

Foram realizadas reações de PCR individualmente com as sequências de oligonucleotídicos dos genes *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-51} e *ISAbalA*, onde o DNA foi adicionado em uma reação contendo tampão Taq DNA polimerase (1x), cloreto de magnésio (1,5 mM), dNTP (0,2 mM), oligonucleotídeos (200 nM), Taq DNA polimerase (1U/ µL) e água MILLI-Q estéril para completar o volume final de 25 µL da reação. As condições para a amplificação foram: 94°C por 5 minutos, 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, temperatura de anelamento a 52°C durante 45 segundos, 72°C por 2 minutos (35 vezes a

partir da segunda etapa); e uma elongação final a 72°C por 7 minutos e temperatura final de 4°C (ZONG et al., 2008).

A reação de amplificação do gene *qacEΔ1* foi realizada em um volume final de 25 µL contendo 5 µL de DNA adicionados de tampão Taq DNA polimerase (1x), cloreto de magnésio (1,5 mM), dNTP (0,2 mM), oligonucleotídeos (200 nM), Taq DNA polimerase (2,5U/ µL) e água MILLI-Q estéril para completar o volume final da reação. As condições para amplificação foram: 94°C por 3 minutos; 94°C por 30 segundos, temperatura de anelamento a 57°C durante 1 minuto e 30 segundos, 72°C por 60 segundos (30 vezes a partir da segunda etapa), uma elongação final a 72°C por 10 minutos e temperatura final de 4°C (ROMÃO et al., 2011).

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 1,0 X (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2,5 mM, pH8,3). Foi adicionado brometo de etídio (3µL) no preparo do gel. Foram misturados 3µL de tampão de corrida (*loading buffer*) a 5 µL do produto da PCR. Foi utilizado o marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder - LGC Biotecnologia). O gel foi submetido à eletroforese sob corrente constante de 75 V. Depois da corrida, o gel foi visualizado e fotografado sob luz ultravioleta em sistema de documentação de géis (*ImageQuant300*).

Tabela 2

Sequências nucleotídicas dos *primers* específicos utilizados na amplificação dos genes *rpoB*, *bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-51}*, *ISAbalA* e *qacEΔ1*.

Genes	Pares de base (pb)	Sequências de bases
<i>rpoB</i>	400	5'TAYCGYAAAGAYTTGAAAGAAG 3' 5'CMACACCYTTGTMCRTGA 3'
<i>bla_{OXA-23}</i>	1065	5' GATGTGTCATAGTATTCGTCG3' 5'TCACAACAACAAAAGCACT 3'
<i>bla_{OXA-51}</i>	825	5' ATGAACATTAAAGCACTC 3' 5'CTATAAAAATACCTAATTGTTC 3'
<i>ISAbalA</i>	390	5' ATGCAGCGCTTCTTTGCAGG 3' 5'AATGATTGGTGACAATGAAG 3'
<i>qacEΔ1</i>	400	5'CCCGAATTCATGAAAGGGTGGCTT 3' 5'TATAAGCTTTCACCATGGCGTCGG 3'

3.5 SEQUENCIAMENTO GENÉTICO

3.4.1 Purificação do produto da PCR

Os produtos da PCR foram purificados usando a coluna de purificação *Purelink PCR purification kit (Invitrogen)* seguindo as orientações do fabricante. Neste trabalho foram purificados somente os produtos da PCR para amplificação dos genes *rpoB* e *qacEΔ1*.

3.4.2 Determinação das sequências nucleotídicas

Os produtos obtidos pela PCR foram purificados (*Invitrogen; PureLink PCR purification Kit*) e utilizados como molde de DNA para a reação de sequenciamento de suas duas fitas com o sistema comercial (BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit; Applied Biosystems).

As PCRs foram realizadas em microplacas nas seguintes condições: 1 µL de Big Dye Terminator (Perkin Elmer); 5 pmoles do oligonucleotídeo; tampão 5 x (400 mM Tris-HCl pH 9; 10 mM MgCl₂) e 100 - 150 ng de DNA para um volume final de 10 µL. A seguir, as placas contendo as reações foram encaminhadas para a plataforma de sequenciamento do Instituto Oswaldo Cruz (IOC). Após o sequenciamento das amostras os dados foram analisados pelo software DNASTAR e posteriormente as sequências selecionadas foram submetidas ao programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (ALTSCHUL et al, 1997), e comparadas a outras depositadas no GenBank do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Assim, foi verificada a identidade do material sequenciado por meio do grau de similaridade com sequências depositadas no GenBank.

3.5 SUSCETIBILIDADE AO DESINFETANTE HOSPITALAR À BASE DE QUATERNÁRIO DE AMÔNIO

Foi utilizado um desinfetante hospitalar à base de quaternário de amônio contendo cloreto de dimetil benzil amônio a 10%. Foi realizada uma análise de teor do tensoativo catiônico deste produto pelos tecnologistas do Setor de Saneantes do Departamento de Química do INCQS segundo procedimento preconizado pelo POP INCQS nº 65.3110.014 (MANUAL DA QUALIDADE, 2009).

3.5.1 Avaliação da eficácia do desinfetante pelo Método da Diluição de Uso

A comprovação da eficácia do desinfetante hospitalar utilizado foi avaliada pelo Método da Diluição de Uso, segundo a *Association of Official Analytical Chemists* – AOAC (TOMASINO, 2010) e conforme o POP INCQS nº 65.3210.007 (MANUAL DA QUALIDADE, 2009).

A partir de culturas estoque (*Staphylococcus aureus* INCQS n.º 00039 - ATCC n.º 6538, *Salmonella choleraesuis* INCQS n.º 00028 - ATCC n.º 10708 e *Pseudomonas aeruginosa* INCQS n.º 00025 - ATCC n.º 15442) foram inoculados 10 mL de caldo nutriente, incubados por 22 a 26 h a $36 \pm 1^\circ\text{C}$, correspondendo ao 1º repique. Foram realizados dois repiques consecutivos em 10 mL de caldo nutriente, incubados por 22 a 26 h a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Um 4º repique consecutivo inoculado em sete tubos ou mais contendo 20 mL de caldo nutriente, foi obtido após incubação por 48 - 54 horas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Após a incubação, essa cultura foi utilizada para contaminar os cilindros de aço inoxidável durante 15 ± 2 min, mantidos à temperatura ambiente (**Figura 4**).

Após o tempo de contato, esses cilindros foram retirados e dispostos verticalmente em placas de Petri forradas com duas folhas de papel de filtro em condições assépticas e incubados a $36 \pm 1^\circ\text{C}$, durante 38 a 42 minutos. Cada um dos cilindros foi transferido em intervalos de 30 segundos, cronometradamente, para os respectivos tubos contendo 10 mL do desinfetante, durante 10 minutos de exposição, à temperatura de 20°C . Passado esse tempo de contato, os cilindros foram transferidos

para os respectivos tubos contendo 10 mL de meio de cultura com neutralizante do princípio ativo do desinfetante; para este ensaio utilizou-se caldo Lethenn (caldo nutriente com lecitina e polissorbato 80), em intervalos constantes de 30 segundos entre cada tubo. Após 40 minutos de neutralização no tubo com meio de cultura específico (subcultura), cada cilindro foi transferido para outra série de tubos com o mesmo meio de cultura (re-subcultura). Todos os tubos de subcultura e re-subcultura foram incubados a $36 \pm 1^\circ\text{C}$, durante 48 ± 2 horas (**Figura 5**).

Esse procedimento foi realizado utilizando-se 60 cilindros de aço inoxidável. Observou-se a presença ou ausência de crescimento bacteriano. O desinfetante foi considerado satisfatório, quando capaz de eliminar o microrganismo teste em 59 dos 60 cilindros utilizados (para um nível de confiança de 95%).

Foram realizados também os controles do ensaio, viabilidade e esterilidade do meio de cultura, esterilidade dos lotes de pipetas, esterilidade dos cilindros carreadores de aço inox e a contagem das células viáveis recuperadas dos cilindros de aço inox (controle obrigatório para *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* sugerido para *Salmonella choleraesuis*).

A contagem de unidades formadoras de colônias (UFC)/cilindro de aço inox foi realizada a partir de um cilindro contaminado de cada placa de Petri após o tempo de secagem, sendo esse cilindro submetido a sonicação em 10 mL de caldo Lethenn por um minuto e agitação por um minuto. Em seguida, foram realizadas diluições sucessivas de 1 mL do caldo Lethenn em 9 mL de tampão fosfato. Alíquotas de 0,1 mL dessas diluições foram plaqueadas por *spread plate* em TSA em duplicata, incubadas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 - 48 horas. A contagem das colônias foi realizada apenas nas placas com faixa de colônias de 0 a 300, placas com contagem acima de 300 colônias não foram utilizadas para calcular o número de UFC/cilindro de aço inox. O cálculo das UFC por mL de caldo foi realizado pelo somatório das médias calculadas de cada diluição dividido pelo somatório das diluições consideradas para o cálculo, o valor encontrado foi multiplicado por 10, pois é o valor do volume total do caldo Lethenn em que a bactéria foi recuperada a partir do carreador. Este valor corresponde à média da densidade geométrica do teste. Foi calculada a média da densidade logarítmica (\log^M) do carreador a partir da média da densidade geométrica. Para não invalidar o ensaio, a média da densidade logarítmica por cilindro tem que ser sempre maior que 6,0.

3.5.2 Avaliação da suscetibilidade de *A. baumannii* ao desinfetante hospitalar

O perfil de suscetibilidade ao desinfetante hospitalar foi realizado apenas para os isolados de *A. baumannii* em que foi detectada a presença do gene *qacEΔ1* e para a cepa de referência de *Acinetobacter baumannii* INCQS nº 00143 - ATCC 19606.

A metodologia adotada para a avaliação da suscetibilidade bacteriana ao desinfetante foi a mesma utilizada para avaliação da eficácia do desinfetante, Método da Diluição de Uso, segundo estabelecido pela *Association of Official Analytical Chemists* – AOAC (TOMASINO, 2010).

Figura 4. Esquema de contaminação dos cilindros de aço inoxidável (carreadores) a partir de culturas estoque de *Staphylococcus aureus* INCQS n.º 00039 - ATCC n.º 6538, *Salmonella choleraesuis* INCQS n.º 00028 - ATCC n.º 10708 e *Pseudomonas aeruginosa* INCQS n.º 00025 - ATCC n.º 15442.

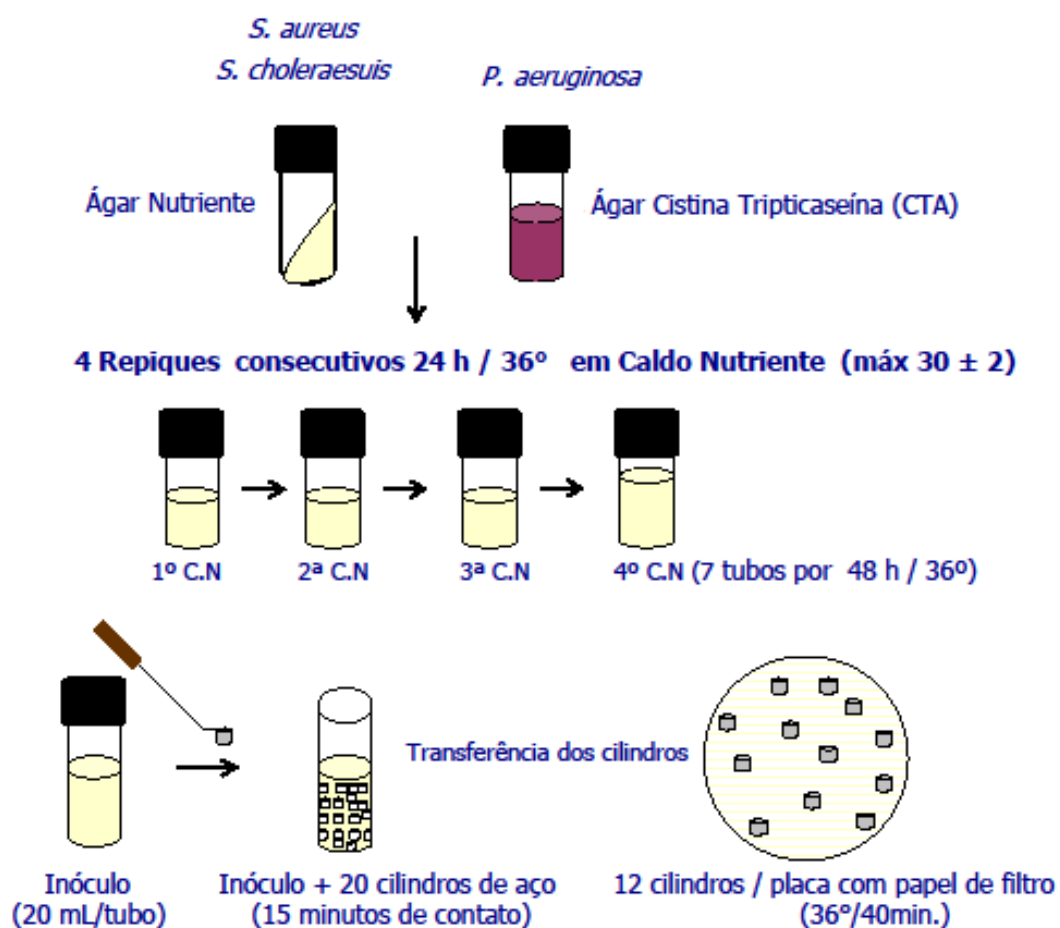
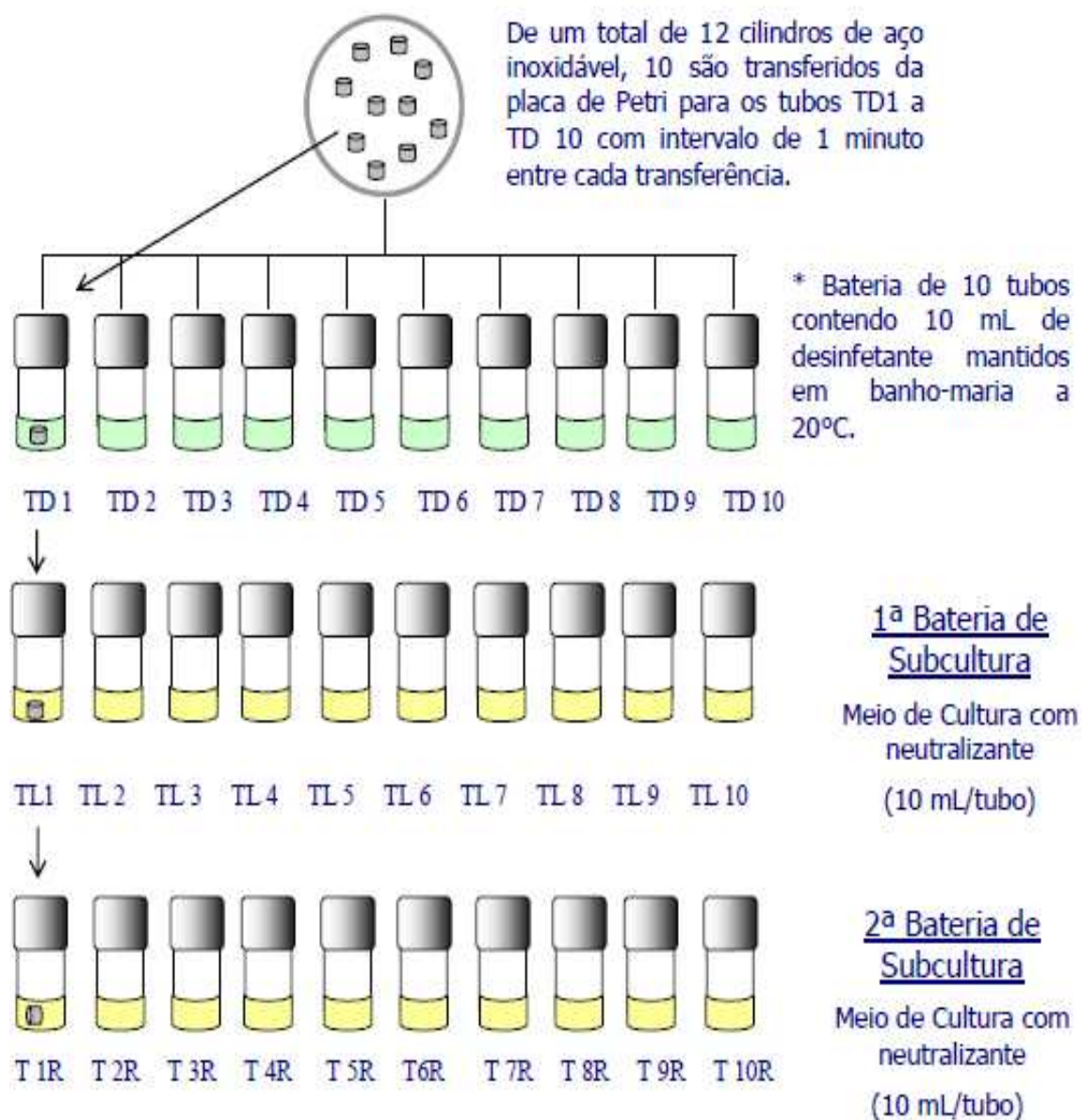


Figura 5. Esquema do Método da Diluição de Uso, segundo estabelecido pela *Association of Official Analytical Chemists – AOAC*.



* Pode-se utilizar 1 bateria com 20 tubos e intervalo de 30 segundos entre cada transferência.

3.5.3 Concentração Inibitória Mínima do Desinfetante

A determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) do desinfetante à base de compostos quaternários de amônio foi realizada de acordo com Al-Masaudi e colaboradores (1991), com modificações. A cepa de referência *Acinetobacter baumannii* INCQS nº 00143 - ATCC 19606 e os isolados de *A. baumannii* foram cultivados em meio TSB por 24 h a 37°C e os CIMs determinados pela adição do desinfetante com concentrações variando de 1 a 20 ppm, diluídos também em meio TSB.

Em cada poço da microplaca de ELISA, foram adicionados 2 µL do inóculo padronizado com cerca de 2×10^5 UFC/mL, em seguida adicionados 198 µL desinfetante em diferentes concentrações (1 a 20 ppm), diluídos em meio TSB, em seus respectivos poços e incubados por 24 e 48 h a 37°C. Foi considerada como a concentração inibitória mínima, aquela correspondente a menor concentração do desinfetante que não forneceu crescimento visível. Os isolados e a cepa de referência de *A. baumannii* também foram cultivados na ausência do desinfetante como controle positivo.

3.7 AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE À DESSECAÇÃO

3.7.1 Contaminação de superfícies fixas por *A. baumannii*

Analisou-se a capacidade de sobrevivência em ambientes escassos de água de um isolado *Acinetobacter baumannii*, que foi escolhido por apresentar em seu genoma todos os genes pesquisados neste trabalho, além de apresentar resistência a todos os antimicrobianos e concentração inibitória mínima elevada para o desinfetante hospitalar.

A determinação da suscetibilidade à dessecação foi adaptada a partir dos procedimentos estabelecidos no Método da Diluição de Uso para recuperação e contagem das células viáveis dos cilindros de aço inox utilizados em cada ensaio. Como

controle do ensaio, foi utilizada a cepa de referência *Salmonella choleraesuis* INCQS n.º 00028 - ATCC n.º 10708 (TOMASINO, 2010; WENDT et al., 1997).

A partir da cultura estoque foram inoculados 10 mL de TSB, incubados por 22 a 26 h a $36 \pm 1^\circ\text{C}$, correspondendo ao 1º repique. Foram realizados dois repiques consecutivos em 10 mL de TSB, incubados por 22 a 26 h a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Foi realizado um 4º repique consecutivo inoculado em sete tubos ou mais com 20 mL de TSB, incubados por 48 - 54 horas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Essa cultura foi utilizada para contaminar os cilindros de aço inoxidável durante 15 ± 2 min, mantidos à temperatura ambiente.

Após o tempo de contato, esses cilindros foram retirados e dispostos verticalmente em placas de Petri forradas com duas folhas de papel de filtro em condições assépticas e incubados a $36 \pm 1^\circ\text{C}$, durante 38 a 42 minutos, para que ocorresse adsorção das células à superfície de aço. Todas as placas de Petri foram devidamente identificadas e acondicionadas à temperatura ambiente por até 40 dias.

3.7.2 Recuperação das células viáveis

A recuperação das células viáveis de *A. baumannii* foi realizada a partir de três cilindros contaminados de cada placa de Petri após tempos específicos de acondicionamento, 40 minutos, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 30 e 40 dias. Através de sonicação em 10 mL de caldo TSB por um minuto e agitação por um minuto em agitador, as possíveis células viáveis foram recuperadas das superfícies contaminadas. Em seguida, foram realizadas diluições sucessivas de 1 mL do caldo TSB em 9 mL de tampão fosfato. Alíquotas de 0,1 mL dessas diluições foram plaqueadas por *spread plate* em TSA em duplicata, as placas e o tubo contendo meio TSA com os cilindros foram incubados a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 - 48 horas.

Foi realizada a contagem das colônias nas placas com faixa de colônias de 0 a 300 e observou-se a presença ou ausência de crescimento bacteriano nos tubos contendo os cilindros contaminados e secos. Placas com contagem acima de 300 colônias não foram utilizadas para calcular o número de UFC por carreador.

Foram realizados também os controles do ensaio, viabilidade e esterilidade do meio de cultura e esterilidade dos cilindros carreadores de aço inox.

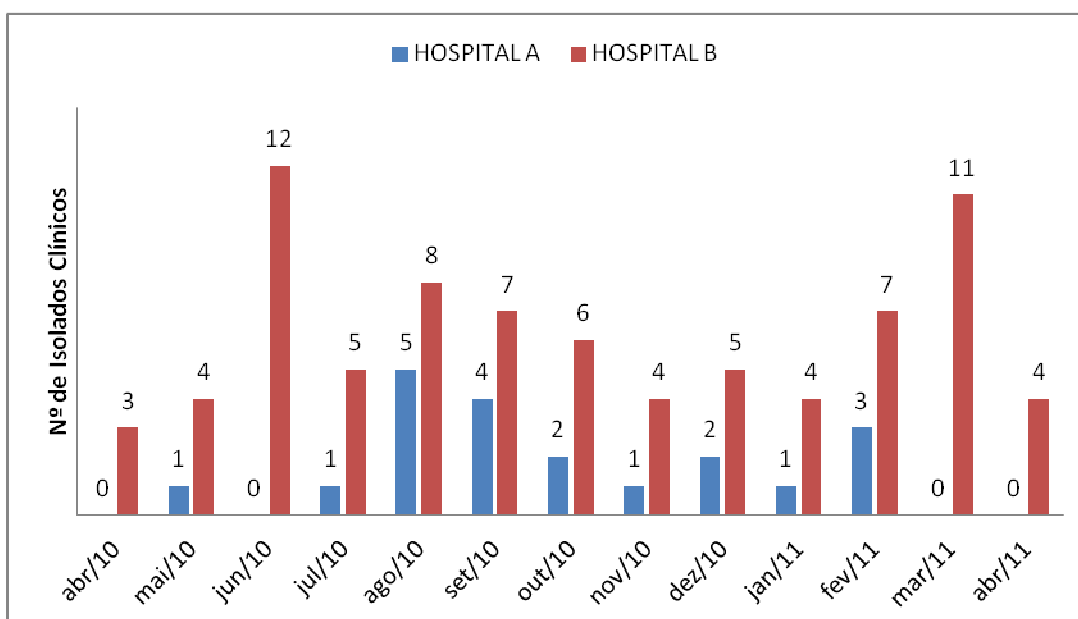
4 RESULTADOS

4.1 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS

Foram efetuadas provas bioquímicas convencionais para todos os isolados clínicos oriundos dos dois hospitais (cerca de 140 isolados). Posteriormente à realização das provas bioquímicas convencionais, apenas 100 isolados clínicos foram identificados como pertencentes ao complexo *Acinetobacter baumannii* – *calcoaceticus*. Estes foram submetidos à identificação automatizada utilizando o cartão para identificação de Gram-negativos (GN, referência 21341) no sistema Vitek 2 (bioMérieux Vitek Systems Inc., Hazelwood, MO). Essa nova identificação ratificou os resultados da identificação bioquímica convencional, já que os 100 isolados clínicos também foram identificados como pertencentes ao complexo *Acinetobacter baumannii* – *calcoaceticus*.

Foram incluídos no estudo os 100 isolados clínicos que tiveram sua identificação confirmada tanto pelas provas bioquímicas convencionais quanto pelo sistema Vitek 2 como espécies pertencentes ao complexo *Acinetobacter baumannii* – *calcoaceticus*. (Figura 6)

Figura 6. Número de isolados clínicos identificados como complexo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* durante o período do estudo, que foram coletados nos dois hospitais da rede pública do município do Rio de Janeiro.



Os 100 isolados clínicos foram identificados pela metodologia fenotípica apenas como pertencentes ao complexo *Acinetobacter baumannii* – *calcoaceticus*. Não foi possível diferenciar as espécies *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. pittii* e *A. nosocomialis* pertencentes ao referido complexo.

Os 100 isolados clínicos pertencentes ao complexo ACB obtidos foram oriundos dos seguintes sítios de coleta: urina (19; 19%), secreção traqueal (19; 19%), sangue (16; 16%), ponta de cateter intravascular (15; 15%), secreção de úlceras (9; 9%), lavado brônquico de pacientes com pneumonia associada à ventilação mecânica (9; 9%), fragmento vascular (2; 2%), secreção peritoneal (2; 2%) e sítio de coleta não informado (8; 8%), conforme demonstrado na **Tabela 3**.

Tabela 3

Prevalência de isolados clínicos pertencentes ao complexo *Acinetobacter baumannii* – *calcoaceticus* no período de 2010 a 2011 e a distribuição por diferentes sítios de coleta

Complexo <i>Acinetobacter baumannii</i> – <i>calcoaceticus</i>		
Período		
Tipo de infecção/colonização	2010 (Nº)	2011 (Nº)
Cateter	8	7
Corrente sanguínea	11	5
Fragmento vascular	0	3
Lavado brônquico	7	2
Secreção peritoneal	1	1
Secreção traqueal	14	5
Secreção de úlceras	7	2
Urina	14	5
Outros espécimes clínicas	7	1
Total	69	31

Nº = número de isolados clínicos coletados

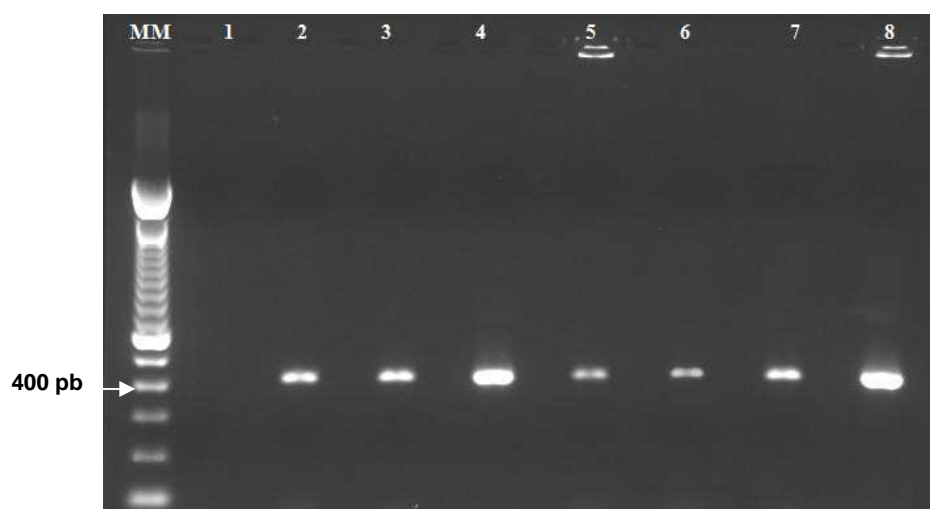
4.2 VERIFICAÇÃO DA PRESENÇA DOS GENES *rpoB*, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-51}, *ISAbal* e *qacEΔ1*

4.2.1 Identificação das espécies do complexo ACB pela amplificação e sequenciamento do gene *rpoB*

Devido à insuficiência de provas fenotípicas que permitissem a diferenciação das espécies bacterianas pertencentes ao complexo ACB, neste estudo foi necessário o uso de métodos moleculares para identificá-las. Realizou-se a amplificação por PCR e sequenciamento da região específica do gene *rpoB*, identificada como zona 1, de aproximadamente 400 pb. A análise desta sequência possibilitou a diferenciação das espécies pertencentes ao complexo ACB (La SCOLA et al., 2006).

Pela PCR os 100 isolados apresentaram o amplicon de aproximadamente 400 pb, referente à zona 1 do gene *rpoB*. Todos estes amplicons foram sequenciados e as sequências comparadas com as depositadas no GenBank, utilizando-se a ferramenta BLAST. Deste modo, foi possível identificar genotipicamente todas as espécies pertencentes ao complexo *Acinetobacter baumannii* – *calcoaceticus* (**Figura 7**).

Figura 7. Amplificação da região 1 do gene *rpoB* em isolados identificados como complexo ACB. MM: Marcador Molecular: 100 pb DNA Ladder – LGC; 1: Controle Negativo; 2-8: amplicon do gene *rpoB*.



Dentre os 100 isolados clínicos pertencentes ao complexo ACB, foi possível observar que 94 (94%) pertenciam à espécie *Acinetobacter baumannii*, 5 (5%) à espécie *Acinetobacter nosocomialis* e 1 (1%) à espécie *Acinetobacter pittii*. Foi possível observar que o isolamento de *A. baumannii* ocorreu independente do espécime clínica, porém com maior percentual de isolados em secreção traqueal e urina, quando comparado aos outros sítios de coleta. A única cepa *A. pittii* foi isolada de urina, enquanto as cinco cepas de *A. nosocomialis* foram isoladas de quatro sítios distintos, com predomínio na corrente sanguínea, como mostrado no **Quadro 1**.

Dentre todos os amplicons sequenciados foram selecionados 19 para montagem da árvore filogenética, sendo que 15 isolados apresentaram 93 % de similaridade com a cepa *A. baumannii* DQ207451, 3 isolados 99% de similaridade com *A. nosocomialis* EU445680 e um isolado com 98% de similaridade com a cepa *A. pittii* JQ838184.

Quadro 1. Distribuição das diferentes espécies pertencentes ao complexo *Acinetobacter baumannii* – *calcoaceticus* isoladas de pacientes hospitalizados, de acordo com as fontes de isolamento.

ESPÉCIE BACTERIANA (n°; %)	GENE <i>rpoB</i>(Zona 1) (n°; %)	FONTE DE ISOLAMENTO (n°)
<i>Acinetobacter pittii</i> (1; 1%)	PRESENTE (1;100%)	Urina (1)
<i>Acinetobacter nosocomialis</i> (5; 5%)	PRESENTE (5;100%)	Secreção de Úlceras (1)
		Corrente Sanguínea (2)
		Urina (1)
		Outros espécimes clínicas (1)
<i>Acinetobacter baumannii</i> (94; 94%)	PRESENTE (94;100%)	Lavado brônquico (9)
		Cateter (15)
		Corrente Sanguínea (14)
		Secreção Traqueal (19)
		Urina (17)
		Secreção Peritoneal (2)
		Secreção de Úlceras (8)
		Fragmento Vascular (3)
Outros espécimes clínicas (7)		

4.2.2 Detecção dos genes *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-51} e *ISAbal*

Dentre os 100 isolados estudados, foram pesquisados dois genes codificadores de oxacilinas e uma sequência de inserção, *ISAbal*, que está diretamente relacionada ao aumento da expressão desses genes de resistência, e segundo alguns estudos, também está exclusivamente relacionada à espécie *A. baumannii* (MUGNIER et al., 2009).

Na PCR para amplificação do gene *bla*_{OXA-51} apenas as espécies *A. baumannii* e *A. nosocomialis*, foram positivas, detectou-se em 93 (98,94%) isolados de *A. baumannii* e em 2 (40%) de *A. nosocomialis*. O isolado de *A. pittii* não apresentou este gene codificador.

Dos 94 isolados de *A. baumannii*, 89 (94,68%) apresentaram o gene *bla*_{OXA-23}, enquanto em *A. nosocomialis* o gene estava presente em 3 (60%) dos isolados. O gene estava presente no único isolado de *A. pittii*.

De acordo com a pesquisa do gene referente à sequência de inserção *ISAbal*, todas os isolados de *A. baumannii* (94; 100%) apresentaram fragmentos amplificados compatíveis com a sequência, 4 (80%) isolados de *A. nosocomialis* e 1 de *A. pittii* também foram positivos para *ISAbal* (**Quadro 2**).

Quadro 2. Presença dos genes *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-51} e sequência de inserção *ISAbal* nos isolados de *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter pittii* e *Acinetobacter nosocomialis*.

Genes e Sequência de Inserção	<i>A. baumannii</i> total = 94	<i>A. nosocomialis</i> total = 5	<i>A. pittii</i> total = 1
	Presença n° (%)	Presença n° (%)	Presença n° (%)
<i>bla</i> _{oxa-23}	89 (94,68)	3 (60)	1 (100)
<i>bla</i> _{oxa-51}	93 (98,94)	2 (40)	0 (0)
<i>ISAbal</i>	94 (100)	4 (80)	1 (100)

Pelos resultados obtidos na pesquisa dos genes que conferem resistência aos agentes antimicrobianos e a sequência de inserção, foi possível detectar que houve a correlação da presença dos dois genes codificadores de oxacilinas e a sequência de inserção em 94,7% (89) dos isolados de *A. baumannii*, e somente em um isolado de *A. nosocomialis*.

Nos outros 4,2% (4) dos isolados de *A. baumannii*, apenas o gene *bla_{oxa-23}* estava ausente, e em um único isolado não foram detectados os dois genes codificadores de oxacilinasas, estando presente apenas a sequência de inserção *ISAbal*.

Dentre os demais isolados identificados como *A. nosocomialis* e *A. pittii* verificou-se a ocorrência simultânea do gene da sequência de inserção com o gene *bla_{oxa-23}* em 2 (40%) isolados *A. nosocomialis* e no único isolado *A. pittii* (**Quadro 3**).

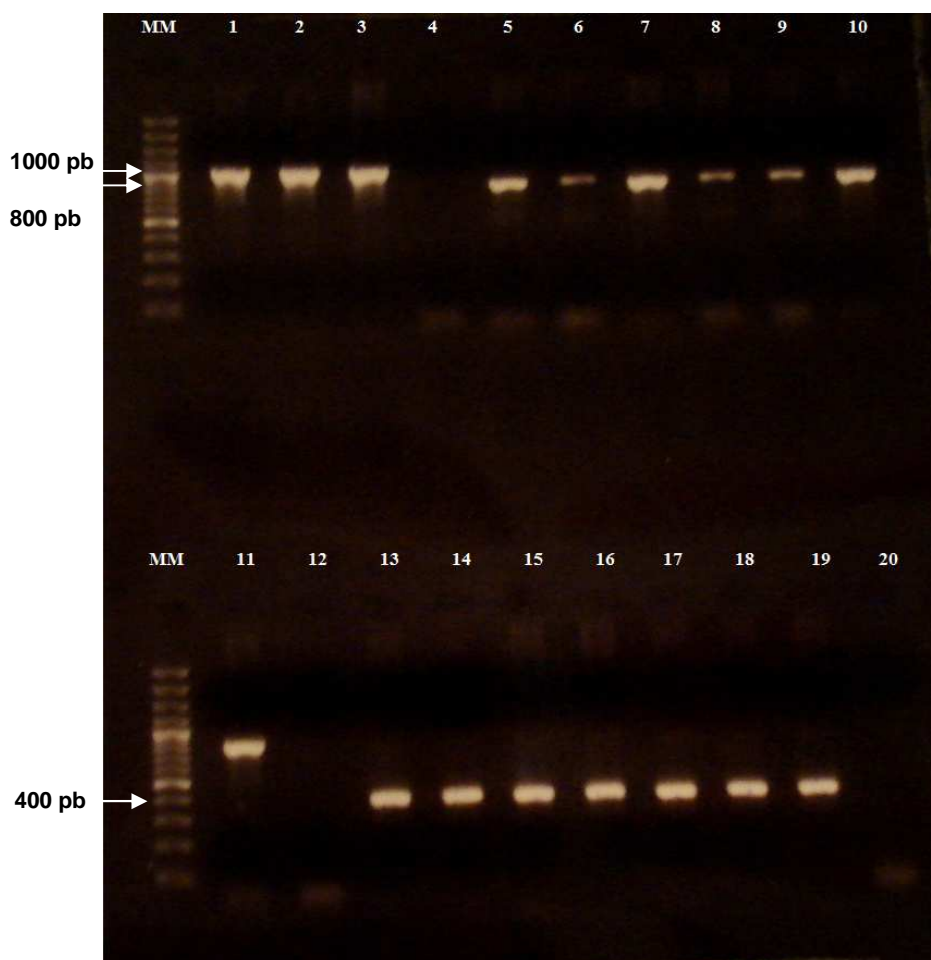
Quadro 3. Ocorrência simultânea dos genes *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-51} e sequência de inserção *ISAbal* nos isolados de *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter pittii* e *Acinetobacter nosocomialis*.

ESPÉCIE BACTERIANA (n°; %)	PRESENÇA 2 GENES E SI (n°; %)	PRESENÇA 1 GENE E SI (n°; %)		PRESENÇA SOMENTE DE 1 GENE OU SI (n°; %)		
	<i>bla</i> _{oxa-23} + <i>bla</i> _{oxa-51} + <i>ISAbal</i>	<i>bla</i> _{oxa-23} + <i>ISAbal</i>	<i>bla</i> _{oxa-51} + <i>ISAbal</i>	<i>bla</i> _{oxa-23}	<i>bla</i> _{oxa-51}	<i>ISAbal</i>
<i>Acinetobacter pittii</i> (1; 1%)	0	Positiva (1;100%)	0	0	0	0
<i>Acinetobacter nosocomialis</i> (5; 5%)	Positiva (1; 20%)	Positivas (2; 40%)	0	0	Positiva (1; 40%)	Positiva (1;40 %)
<i>Acinetobacterbaumannii</i> (94; 94%)	Positivas (89; 94,7%)	0	Positivas (4; 4,2%)	0	0	Positiva (1; 1,1%)

SI - Sequência de Inserção

A **Figura 8** apresenta os produtos de amplificação por PCR de alguns isolados, bem como o peso molecular de cada gene, confirmando o previsto na literatura.

Figura 8. Amplificação dos genes *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-51} e sequência de inserção *ISAbal* em isolados de *A. baumannii*, *A. pittii* e *A. nosocomialis*. MM – Marcador Molecular: 100 pb DNA Ladder – LGC 1-3: *bla*_{oxa-23}, 4: Controle Negativo; 5-11: *bla*_{oxa-51}; 12: Controle Negativo; 13-19: *ISAbal*; 20: Controle Negativo.



4.2.3 Detecção do gene *qacEΔ1*

O gene que codifica resistência a compostos de quaternário de amônio foi pesquisado por PCR nos 100 isolados estudados. Amplicons de aproximadamente 400 pb, referente ao gene *qacEΔ1* foram detectados em apenas 5 (5%) isolados de *A. baumannii* (**Figura 9 e Tabela 4**).

Todos os amplicons foram purificados para serem sequenciados em seguida. Utilizando-se a ferramenta BLAST, as cinco seqüências estudadas apresentaram afinidade de 100% no alinhamento realizado com seqüências do gene *qacEΔ1* depositadas no GenBank.

Figura 9. Amplificação do gene *qacEΔ1* em isolados de *A. baumannii*. MM – Marcador Molecular: 100 pb DNA Ladder – LGC. 1-5: *qacEΔ1* 6: Controle Negativo.

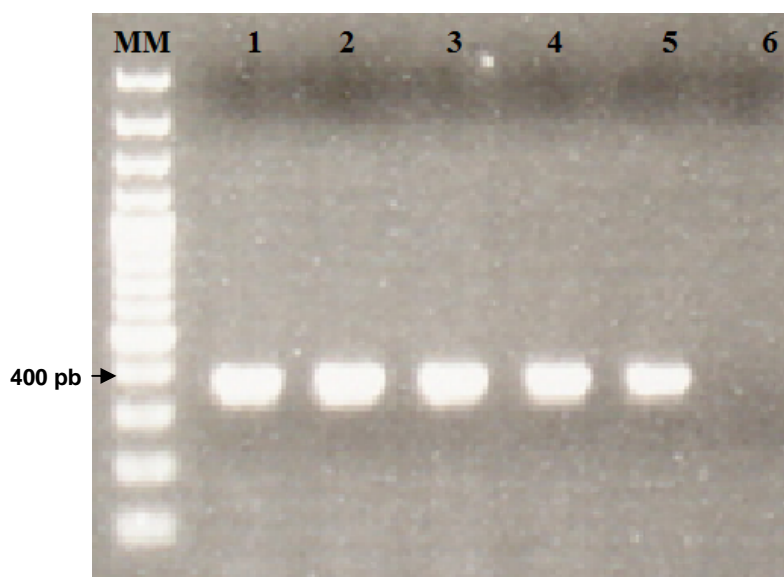


Tabela 4.

Presença do gene *qacEΔI* nos isolados de *Acinetobacter baumannii* e sua distribuição em diferentes espécimes clínicos.

ESPÉCIE BACTERIANA (n; %)	PRESENÇA DE <i>qacEΔI</i> (n;%)	ISOLA-DO	ORIGEM	DATA	HOSPITAL
<i>A. baumannii</i> (94; 94%)	Positivas (5; 5,3%)	SA/1	Secreção Peritoneal	06/07/10	B
		SC/11	Cateter	12/08/10	B
		SS/9	Corrente Sanguínea	10/08/10	B
		ST/6	Secreção Traqueal	29/06/10	B
		SUL/3	Secreção de Úlceras	01/06/10	B

4.3 TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

De acordo com o perfil de suscetibilidade apresentado pelos isolados às classes de antimicrobianos (**Quadros 4 e 5**), estes foram classificados em cepas multirresistentes (MDR), panresistentes (PDR) e não-multiresistentes (n-MDR).

Foram encontradas 87 (92,5%) isolados de *A. baumannii*, que apresentaram perfil de multirresistência (MDR). Sete isolados (7,5%) (GNI/5, ST/7, SU/10, SU/3, SU/8, SU/9 e SUL/5) apresentaram perfil não multirresistente (n-MDR), com resistência apenas à ampicilina (penicilina), cefalotina e ceftazidima (cefalosporinas) e nenhum isolado se mostrou panresistente.

Os antimicrobianos aos quais os isolados de *A. baumannii* apresentaram menor suscetibilidade foram ampicilina (94; 100%), cefalotina (94; 100%) e ceftazidima (94; 100%). Por outro lado, o antimicrobiano que se apresentou mais efetivo *in vitro* contra os isolados foi a colistina (93; 98,9%), tigeciclina (80; 85,1%) e amicacina (75; 79,8%). A **Figura 10** demonstra, em porcentagens, resultado dos testes de suscetibilidade aos antimicrobianos das cepas de *A. baumannii*.

Quadro 4. Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados pertencentes ao complexo *Acinetobacter baumannii* – *calcoaceticus* obtido pelo sistema Vitek 2.

Espécie	Isolado	AM	SAM	TZP	CF	FOX	CTX	CAZ	FEP	ATM	IPM	MEM	NA	GM	CIP	TGC	CS	
<i>A. baumannii</i>	GBAL/1	R	S	R	R	R	R	R	I	R	S	S	S	R	R	S	S	
	GC/1	R	I	R	R	R	R	I	R	R	R	R	S	R	R	S	S	
	GNI/2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	
	GNI/3	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	
	GNI/4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	
	GNI/5	R	S	S	R	R	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	
	GNI/6	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	
	GNI/7	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	
	GT/1	R	I	R	R	R	I	S	R	R	R	R	S	R	R	S	S	
	GT/2	R	I	R	R	R	R	I	R	R	R	R	S	R	R	S	S	
	GT/3	R	I	R	R	R	R	I	R	R	R	R	S	R	R	S	S	
	GT/4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	
	GT/5	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	
	GT/6	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	
	GT/7	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	
	GUL/2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	
	GUL/3	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	
	GUL/4	R	S	S	R	R	S	S	S	I	S	S	S	S	I	S	S	
	SA/1	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	I	S	
	SA/2	R	S	S	R	R	I	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	
	SBAL/1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	
	SC/1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S
	SC/2	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	I	R	R	S	S
	SC/3	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S
	SC/4	R	S	R	R	R	R	R	I	R	S	S	S	S	R	S	S	
	SC/5	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	S	R	R	I	S	
	SC/6	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	
	SC/7	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	
	SC/8	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
	SC/9	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	
	SC/10	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	S	S	R	S	S	
	SC/11	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	
	SC/12	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	R	S	R	R	S	S	
	SC/13	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
	SC/14	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
	SMBAL/1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S
	SMBAL/2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	I	S
	SMBAL/3	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S

AMP-ampicilina, SAM-ampicilina-sulbactam, TZP-piperacilina-tazobactam, CF-cefalotina, FOX-cefoxitina, CTX-cefotaxima, CAZ-ceftazidima, FEP-cefepima, ATM-aztreonam, IPM-imipenem, MEM-meropenem, NA-amicacina, GM-gentamicina, CIP-ciprofloxacino, TGC-tigeciclina, CS-colistina. S - Sensibilidade, I - Resistência intermediária, R - Resistência.

Quadro 4 (Cont.). Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados pertencentes ao complexo *Acinetobacter baumannii* – *calcoaceticus* obtido pelo sistema Vitek 2.

Espécie	Isolado	AM	SAM	TZP	CF	FOX	CTX	CAZ	FEP	ATM	IPM	MEM	NA	GM	CIP	TGC	CS	
<i>A. baumannii</i>	SMBAL/4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	
	SMBAL/5	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	
	SMBAL/6	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	
	SMBAL/7	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	
	SNI/1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	
	SS/1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	
	SS/2	R	I	R	R	R	I	S	R	I	R	R	S	R	R	S	S	
	SS/4	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S	
	SS/5	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	
	SS/6	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	
	SS/7	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	I	S	
	SS/8	R	I	R	R	R	R	I	R	R	R	R	S	R	R	S	S	
	SS/9	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	S	
	SS/10	R	S	I	R	R	R	I	I	R	S	S	S	S	S	S	S	
	SS/11	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	R	S	R	R	S	S	
	SS/13	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	
	SS/14	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	
	SS/15	R	S	I	R	R	R	I	S	R	S	S	S	S	S	S	S	
	SS/16	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
	ST/1	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	S	
	ST/2	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I	R	S	S	
	ST/3	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	
	ST/4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	
	ST/5	R	S	R	R	R	R	R	R	R	I	I	S	R	R	S	S	
	ST/6	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	
	ST/7	R*	S	S	R	R	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	
	ST/8	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	
	ST/9	R	R	R	R	R	I	S	R	I	R	R	S	R	R	S	S	
	ST/10	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	R	S	S	
	ST/11	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	
	ST/12	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	
	SU/1	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	
	SU/2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	
SU/4	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S		
SU/5	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	I	S		
SU/6	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S		
SU/7	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S		
SU/8	R	S	S	R	R	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S		
SU/9	R	S	S	R	R	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S		
SU/10	R	S	S	R	R	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S		

AMP-ampicilina, SAM-ampicilina-sulbactam, TZP-piperacilina-tazobactam, CF-cefalotina, FOX-cefoxitina, CTX-cefotaxima, CAZ-ceftazidima, FEP-cefepima, ATM-aztreonam, IPM-imipenem, MEM-meropenem, NA-amicacina, GM-gentamicina, CIP-ciprofloxacino, TGC-tigeciclina, CS-colistina . S - Sensibilidade, I - Resistência intermediária, R - Resistência.

Quadro 4 (Cont.). Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados pertencentes ao complexo *Acinetobacter baumannii* – *calcoaceticus* obtido pelo sistema Vitek 2.

Espécie	Isolado	AM	SAM	TZP	CF	FOX	CTX	CAZ	FEP	ATM	IPM	MEM	NA	GM	CIP	TGC	CS	
<i>A. baumannii</i>	SU/11	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	
	SU/12	R	I	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	S	R	I	S	
	SU/13	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	
	SU/14	R	S	R	R	R	R	R	S	I	R	I	S	R	R	I	S	
	SU/15	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	
	SU/17	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	
	SU/18	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	S	R	R	S	S	
	SU/19	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	R	S	R	R	S	S	
	SUL/1	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	R	S	R	R	S	S	
	SUL/2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S
	SUL/3	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	
	SUL/4	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	R	S	R	R	S	S	
	SUL/5	R	S	S	R	R	I	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	
	SV/1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	
	SV/2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	R	S	S	
SV/3	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	
<i>A. nosocomialis</i>	GNI/1	R	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	
	GUL/1	R	S	S	R	R	I	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	
	SS/3	R	S	R	R	R	R	I	I	R	S	S	S	S	S	S	S	
	SS/12	R	S	S	R	R	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	
	SU/16	R	S	S	R	R	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	
<i>A. pittii</i>	SU/3	R	S	S	R	R	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	

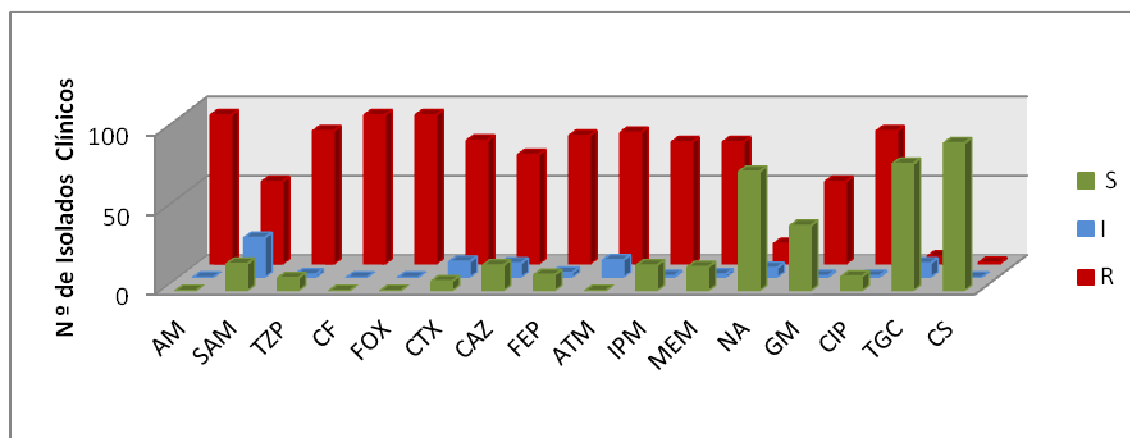
AMP-ampicilina, SAM-ampicilina-sulbactam, TZP-piperacilina-tazobactam, CF-cefalotina, FOX-cefoxitina, CTX-cefotaxima, CAZ-ceftazidima, FEP-cefepima, ATM-aztreonam, IPM-imipenem, MEM-meropenem, NA-amicacina, GM-gentamicina, CIP-ciprofloxacino, TGC-tigeciclina, CS-colistina . S - Sensibilidade, I - Resistência intermediária, R - Resistência.

Quadro 5. Resumo do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos dos 94 isolados identificados como *Acinetobacter baumannii* durante período do estudo de 2010 a 2011.

Classes	Agentes Antimicrobianos	Interpretação <i>breakpoint</i> CLSI		
		S nº (%)	I nº (%)	R nº (%)
Penicilinas	Ampicilina	0 (0)	0 (0)	94 (100)
	Ampicilina e Sulbactam	17 (18,1)	25 (26,6)	52 (55,3)
	Piperacilina e Tazobactam	8 (8,5)	2 (2,1)	84 (89,4)
Cefalosporinas 1ª geração	Cefalotina	0 (0)	0 (0)	94 (100)
Cefalosporinas 2ª geração	Cefoxitina	0 (0)	0 (0)	94 (100)
Cefalosporinas 3ª geração	Cefotaxima	6 (6,4)	10 (10,6)	78 (83)
	Ceftazidima	16 (17)	9 (9,6)	69 (73,4)
Cefalosporinas 4ª geração	Cefepima	10 (10,6)	3 (3,2)	81 (86,2)
Monobactâmicos	Aztreonam	0 (0)	11 (11,7)	83 (88,3)
Carbapenêmicos	Imipenem	16 (17)	1 (1,1)	77 (81,9)
	Merepenem	15 (16)	2 (2,1)	77 (81,9)
Aminoglicosídeos	Amicacina	75 (79,8)	6 (6,4)	13 (13,8)
	Gentamicina	41 (43,6)	1 (1,1)	52 (55,3)
Quinolonas	Ciprofloxacino	9 (9,5)	1 (1,1)	84 (89,4)
Glicilciclinas	Tigeciclina	80 (85,1)	9 (9,6)	5 (5,3)
Antibióticos polipeptídicos	Colistina	93 (98,9)	0 (0)	1 (1,1)

S = sensível; I = intermediária; R = resistente

Figura 10. Suscetibilidade dos 94 isolados de *Acinetobacter baumannii* no período de 2010 a 2011 oriundos dois hospitais da rede pública do município do Rio de Janeiro.



AMP-ampicilina, SAM-ampicilina-sulbactam, TZP-piperacilina-tazobactam, CF-cefalotina, FOX-cefoxitina, CTX-cefotaxima, CAZ-ceftazidima, FEP-cefepima, ATM-aztreonam, IPM-imipenem, MEM-meropenem, NA-amicacina, GM-gentamicina, CIP-ciprofloxacino, TGC-tigeciclina, CS-colistina. S - Sensibilidade, I - Resistência intermediária, R - Resistência.

Entre os 87 isolados clínicos de *A. baumannii*, que apresentaram perfil de multirresistência (MDR), 76 apresentaram resistência aos dois carbapenêmicos (imipenem e meropenem). Dentre os isolados com resistência aos carbapenêmicos, 74 isolados tiveram a presença confirmada dos dois genes codificadores de oxacilinasas, *bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-51}* e da sequência de inserção *ISAba1*. Em dois isolados MDR resistentes aos carbapenêmicos não foram detectados o gene *bla_{OXA-23}* (SU/6, SMBAL/1) e o gene *bla_{OXA-51}* (SMBAL/1).

Os seis isolados de *Acinetobacter* que não pertencem à espécie *A. baumannii* foram mais sensíveis que aqueles pertencentes, sendo que cinco isolados de *A. nosocomialis* e o único isolado de *A. pittii* se mostraram sensíveis aos antimicrobianos das seguintes classes: carbapenêmicos, aminoglicosídeos, quinolonas, gliciliclinas e antibióticos polipeptídicos.

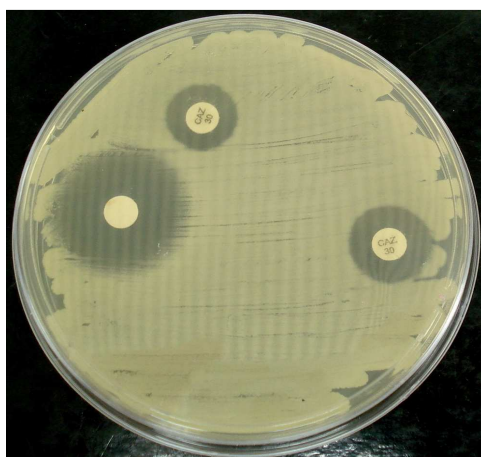
4.4 TESTE DE DETECÇÃO FENOTÍPICA DE METALO- β -LACTAMASES (MBL) A PARTIR DE DISCOS DE CEFTAZIDIMA

A produção de enzima metalo- β -lactamases (MBL) é demonstrada pela visualização do aumento na zona de inibição entre os discos de 2-MPA e de CAZ.

Não foi observada alteração da área entre os halos de inibição produzidos pelos discos 2-MPA e CAZ para todos isolados identificados como *Acinetobacter baumannii* que apresentaram resistência aos dois carbapenêmicos (imipenem e meropenem), confirmando a ausência da produção fenotípica de MBL em 76 isolados.

Para este teste foram utilizados como padrões: *Pseudomonas aeruginosa* VIM-1, *Acinetobacter baumannii* SIM-1 e *Pseudomonas aeruginosa* IMP-1. A **Figura 11** mostra uma cepa com resultado negativo.

Figura 11. Isolado de *Acinetobacter baumannii* negativa para o teste de metalo- β -lactamases (MBL) pelo método de aproximação de discos



4.5 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO DESINFETANTE PELO MÉTODO DA DILUIÇÃO DE USO

A análise química do desinfetante para determinação do teor do princípio ativo quaternário de amônio, mostrou que o mesmo estava em 102% do declarado pelo fabricante, considerado satisfatório pela metodologia INCQS 65.3110.014 (valor de referência: 90 a 110%).

A comprovação da eficácia do desinfetante hospitalar utilizado foi avaliada pelo método da Diluição de Uso frente a cepas de referência *Staphylococcus aureus* INCQS n.º 00039 - ATCC n.º 6538, *Salmonella choleraesuis* INCQS n.º 00028 - ATCC n.º 10708 e *Pseudomonas aeruginosa* INCQS n.º 00025 - ATCC n.º 15442, segundo a *Association of Official Analytical Chemists – AOAC* (TOMASINO, 2010) e conforme o POP INCQS n.º 65.3210.007 (MANUAL DA QUALIDADE, 2009).

Utilizando-se a diluição de 1% e o tempo de contato de 10 minutos, recomendados pelo fabricante, observou-se que não ocorreu crescimento microbiano em nenhum dos 60 cilindros nos ensaios com *S.choleraesuis* e *P. aeruginosa*, enquanto que no ensaio utilizando-se *S.aureus* foi observado o crescimento do microrganismo em apenas 1 cilindro. A presença do mesmo foi confirmada pela coloração de Gram e pelo teste da coagulase. Todos os controles do ensaio apresentaram resultados conforme o esperado. As médias de densidade logarítmica por cilindros nos ensaios realizados, para os três microrganismos respectivamente, foram 6,60 para *S.aureus*, 6,11 para *S.choleraesuis* e 6,56 para *P. aeruginosa*, sendo o limite preconizado pelo método para todos os microrganismos com valor igual a 6.

O desinfetante apresentou resultado satisfatório para atividade bactericida confirmada pelo método da Diluição de Uso, pois o mesmo foi capaz de eliminar os microrganismos oficialmente exigidos pela legislação vigente de acordo com os critérios de aprovação do método.

4.6 AVALIAÇÃO DA SUSTETIBILIDADE DE *A. baumannii* AO DESINFETANTE HOSPITALAR

O método da Diluição de Uso foi realizado para os 5 isolados de *A. baumannii* em que foi detectada a presença do gene *qacEΔ1* e para a cepa de referência *A. baumannii* INCQS nº 00143 - ATCC 19606. Na diluição de 1% e tempo de contato de 10 minutos, recomendados pelo fabricante, a cepa de referência e os isolados SA/1, ST/6 e SUL/3 não apresentaram crescimento em nenhum dos 120 tubos utilizados por ensaio (correspondentes aos 60 cilindros). Nos ensaios com os isolados SC/11 e SS/9 foi verificada e confirmada a presença de crescimento de *A. baumannii*, através de coloração de Gram, apenas em um cilindro. Os controles dos ensaios também apresentaram resultados satisfatórios com médias de densidade logarítma por cilindro todas acima de 6,0, conforme verificado na **Tabela 5**.

4.7 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DO DESINFETANTE

Foram determinadas as CIMs de: 17 isolados identificados como *A. baumannii*; 2 isolados de *A. nosocomialis*; um isolado de *A. pittii*; e uma cepa de referência *A. baumannii* INCQS nº 00143 - ATCC 19606. Os critérios de escolha dos isolados foram os seguintes: (I) detecção do gene *qacEΔ1*, (II) suscetibilidade aos carbapenêmicos, (III) detecção dos genes codificadores de oxacilinasas e (IV) detecção da sequência de inserção IS*Abal*.

As CIMs foram estabelecidas a partir de diluições preparadas do desinfetante em TSB, com concentrações variando de 1 a 20 ppm, segundo a concentração declarada por análise química do teor de quaternários de amônio, definida em 102%.

A faixa de concentração inibitória mínima do desinfetante, que proporcionou ausência de crescimento para a cepa de referência *A. baumannii* foi de 4 ppm e para os isolados de *A. baumannii*, variou de 6 ppm a 14 ppm (**Tabela 5**). Para os isolados *A. nosocomialis* e *A. pittii* esta concentração foi de 7 ppm e 6 ppm, respectivamente (**Quadro 6**).

Tabela 5

Perfil de suscetibilidade dos isolados de *A. baumannii* contendo o gene *qacEΔI* e da cepa de referência ao desinfetante hospitalar de acordo com o método da Diluição de Uso e da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

CEPA	Presença dos genes <i>bla_{oxa-23}+bla_{oxa51} ISAbal+qacEΔI</i>	Cilindros Positivos	Densidade logarítma (M)	CIM (ppm)
SA/1	Positivo	0	6,62	10
SC/11	Positivo	1	6,51	10
SS/9	Positivo	1	6,67	10
ST/6	Positivo	0	6,91	14
SUL/3	Positivo	0	6,2	9
<i>A.baumannii</i> INCQS n° 00143 - ATCC 19606	Negativo	0	6,3	4

Quadro 6. Perfil de suscetibilidade aos carbapenêmicos, Concentração Inibitória Mínima e presença de genes de resistência de alguns isolados de *Acinetobacter*.

ESPÉCIE BACTERIANA (n; %)	HOSPITAL	ISOLADO	CIM QAC (ppm)	PESQUISA DE GENES				SUSCETIBILIDADE AOS CARBAPENÊMICOS			
				<i>bla_{oxa-23}</i>	<i>bla_{oxa-51}</i>	ISAbal	<i>qacEΔI</i>	Imipenem - IMP	Merepenem - MEM	CIM IMP (µg mL ⁻¹)	CIM MEM (µg mL ⁻¹)
<i>A. baumannii</i> (17; 18,1)	A	GNI/5	6	P	P	P	-	S	S	<=1	<=0,25
		GBAL/1	8	P	P	P	-	S	S	<=1	1
	B	ST/7	6	P	P	P	-	S	S	<=1	<=0,25
		SA/2	7	P	P	P	-	S	S	<=1	<=0,25
		SS/10	9	-	P	P	-	S	S	<=1	1
	A	GT/1	6	P	P	P	-	R	R	>=16	>=16
		GT/2	7	P	P	P	-	R	R	>=16	>=16
		GNI/4	7	P	P	P	-	R	R	>=16	>=16
	B	SU/6	7	-	P	P	-	R	R	>=16	>=16
		SMBAL/1	8	-	-	P	-	R	R	>=16	>=16
		SC/3	9	P	P	P	-	S	S	<=1	1
		SUL/3	10	P	P	P	P	R	R	>=16	>=16
		SA/1	10	P	P	P	P	R	R	>=16	>=16
		SC/11	10	P	P	P	P	R	R	>=16	>=16
		SS/9	10	P	P	P	P	R	R	>=16	>=16
SS/8	11	P	P	P	-	R	R	>=16	>=16		
ST/6	14	P	P	P	P	R	R	>=16	>=16		
<i>A. nosocomialis</i> (2; 40)	A	GNI/1	7	-	P	-	-	S	S	<=1	<=0,25
	B	SS/3	7	-	-	P	-	S	S	<=1	0,5
<i>A. pittii</i> (1;100)	B	SU/3	6	P	-	P	-	S	S	<=1	<=0,25

P – presença; (-) ausência; R – resistência; S - sensibilidade.

4.8 AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE À DESSECAÇÃO

Analisou-se a capacidade de sobrevivência em ambientes escassos de água de um único isolado de *Acinetobacter baumannii*. O critério de escolha foi determinado pela presença de todos os genes pesquisados neste trabalho, ser um isolado MDR (com resistência a maioria dos agentes antimicrobianos) e concentração inibitória mínima acima de 10 ppm para o desinfetante hospitalar. Atendendo a todos estes critérios foi estabelecido o isolado SC/11 como cultura para realização deste estudo piloto.

As possíveis células viáveis do isolado SC/11 foram recuperadas dos cilindros previamente contaminados após 40 minutos, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 30 e 40 dias de incubação. Observou-se a presença de crescimento bacteriano nos três tubos contendo os cilindros contaminados de cada ensaio em todos os dias estabelecidos. A presença de células de *A. baumannii* foi confirmada pela coloração de Gram e provas bioquímicas convencionais. Sendo assim, foi possível constatar que o isolado SC/11 foi capaz de sobreviver até o quadragésimo dia de incubação em um ambiente escasso de água.

Como controle do ensaio, foram utilizados cilindros contaminados com *Salmonella choleraesuis* INCQS n.º 00028 - ATCC n.º 10708, sendo que se verificou a presença de crescimento bacteriano nos cilindros incubados até o quinto dia. Após este período não foi observado crescimento bacteriano nos cilindros contaminados.

A média de densidade logarítmica por cilindros no primeiro dia de ensaio realizado, após 40 minutos de incubação, foi de 7,57, o que corresponde a $3,7 \times 10^7$ UFC/mL para os 3 carreadores utilizados. No decorrer do período de execução dos ensaios foi possível verificar a redução das referidas médias, mas não a redução total da carga microbiana, chegando a média de densidade logarítmica final de 3,0, correspondente a $1,0 \times 10^3$ UFC/mL nos carreadores incubados há 40 dias em um ambiente sem água e nutrientes.

5 DISCUSSÃO

É notável a preocupação e o interesse da comunidade científica em estudar *A. baumannii*, principalmente seus fatores de virulência e os diversos mecanismos de resistência a agentes antimicrobianos e biocidas. Diversos estudos estão sendo realizados e cada vez mais novos questionamentos têm sido feitos envolvendo desde medidas de controle à taxonomia do patógeno. Em 2011, Nemeç e colaboradores propuseram uma nova classificação da espécie, pois em 1992 foi proposta por Gerner-Smidt uma nomenclatura que agrupou erroneamente três espécies bacterianas clínicas de maior relevância (*A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis*) com uma espécie ambiental sem relevância clínica (*A. calcoaceticuss*), em complexo ACB. Desde então, esta nomenclatura provavelmente foi a principal causa de contradições em pesquisas científicas, já que muitos pesquisadores e laboratórios ignoraram o termo complexo ACB e passaram a utilizar apenas *A. baumannii* para todos os isolados identificados por técnicas fenotípicas automatizadas (BYUNG-CHAN et al., 2005; RUNNEGAR et al., 2010).

No presente estudo, todos os isolados clínicos foram oriundos de dois hospitais públicos do município do Rio de Janeiro e foram previamente identificados pelos respectivos laboratórios de microbiologia através de testes fenotípicos como *A. baumannii*. Além disso, foi realizada uma triagem nesses isolados clínicos através da utilização de provas bioquímicas convencionais no Setor de Saneantes onde o estudo foi desenvolvido. Isso proporcionou a redução do número de isolados empregados na investigação, de 140 para 100. Com a confirmação da presença de 100 isolados clínicos pertencentes ao complexo ACB, foi realizada a identificação automatizada por meio do sistema Vitek 2 (bioMérieux Vitek Systems Inc., Hazelwood, MO). Novamente obtivemos a confirmação apenas da presença de isolados pertencentes ao complexo ACB. A identificação ao nível de espécie pelo sistema automatizado necessitaria de provas bioquímicas convencionais adicionais preconizadas pelo manual de uso do equipamento, que não foram realizadas.

Na literatura existem vários relatos relacionados à identificação de *A. baumannii* por métodos moleculares. Nessa linha, foi desenvolvido por McCONNELL e colaboradores um método de identificação através da PCR em tempo real usando a

amplificação do gene *ompA* que codifica a proteína de membrana externa A. O gene foi escolhido por estar presente em todos os genomas de *A. baumannii* e também por estar inserido em uma região altamente conservada do mesmo. Segundo os autores o método detectou superfícies contaminadas experimentalmente com alta sensibilidade (100%) quando comparado com os métodos de cultura tradicionais. Trinta e oito por cento das amostras foram positivas pela PCR em tempo real e negativas pela cultura tradicional, possivelmente indicando a presença de DNA que não estava mais associado à células viáveis (McCONNELL et al., 2012).

Entre outros métodos moleculares para identificação e classificação se baseiam: no perfil de informações geradas a partir de todo DNA genômico, como na técnica de hibridização DNA total, que ainda é o padrão de referência, porém este método é trabalhoso e insustentável para ser realizado rotineiramente (BOUVET; GRIMONT, 1986, PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008); na técnica de AFLP, que consiste na digestão do DNA por duas enzimas de restrição e posterior amplificação dos fragmentos pelo uso de adaptadores aos fragmentos obtidos, porém por dificuldades de padronização os resultados não podem ser comparados entre laboratórios (JANSSEN et al., 1997, DIJKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007); no perfil de informações gerado a partir da amplificação de um gene específico e posterior restrição enzimática deste material genético, como na técnica *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis* (ARDRA), (que apresenta como fundamento a análise dos fragmentos de restrição obtidos a partir da restrição enzimática do produto resultante da amplificação do DNA codificador do RNA ribossômico da subunidade 16S (DIJKSHOORN et al., 1998, VANEECHOUTTE et al., 1995), porém já foi observada, a ocorrência de múltiplos perfis entre diferentes cepas pertencentes à mesma espécie, sugerindo diversidade intra-espécie, sendo necessário, um banco de dados extenso de perfis (DIJKSHOORN et al., 1998); na análise da sequência de um gene particular ou parte de uma região genética, como o gene codificador do RNA ribossômico 16S (IBRAHIM; GERNER-SMIDT; LIESACK, 1997); a região intergênica entre os genes codificadores do RNA ribossômico 16S e 23S (ITS) (CHANG et al., 2005), o operon ribossomal completo (GARCÍA-ARATA; GERNER-SMIDT; LÓPEZ-BREA, 1997), o gene *recA* (KRAWCZYK; LEWANDOWSKI; KUR, 2002), o gene *gyrB* (YAMAMOTO; HARAYAMA, 1996) e o gene *rpoB* (LA SCOLA et al., 2006).

Para identificar os isolados clínicos do estudo ao nível de espécie, diferenciando as espécies pertencentes ao complexo ACB, foi realizada a amplificação e sequenciamento do gene *rpoB*. Utilizando-se a mesma abordagem de La Scola e colaboradores (2011), obtivemos como resultado que dentre os 100 isolados clínicos pertencentes ao complexo ACB, 94 (94%) pertenciam à espécie *Acinetobacter baumannii*, 5 (5%) à espécie *Acinetobacter nosocomialis* e 1 (1%) à espécie *Acinetobacter pittii*.

Dentre as espécies do gênero *Acinetobacter*, a vigilância da espécie *A. baumannii* em ambientes hospitalares tornou-se uma preocupação com amplitude mundial. Apesar de ser um microrganismo com poucos fatores de virulência determinados, apresenta grande capacidade de aquisição de possíveis genes de resistência a vários agentes antimicrobianos. Essa aquisição poderia ocorrer através de uma mutação gênica específica ou de uma série de mutações que alterariam a atividade catalítica das enzimas produzidas pelo microrganismo, pela aquisição direta de material genético de outras espécies bacterianas ou pela exposição a níveis subinibitórios de drogas presentes no ambiente que poderiam selecionar subpopulações que já apresentassem fatores de resistência. Em um estudo, realizado por Fournier e colaboradores (2006), foram comparados os genomas de uma cepa de *A. baumannii* AYE multirresistente isolada na França e de uma cepa totalmente suscetível ADF. Na cepa multirresistente foi encontrada uma região genômica de 86 Kb chamada ilha de resistência, contendo 45 genes de resistência. Por análise filogenética e estudos de similaridade foi confirmado que a maioria dos genes encontrados havia sido adquirida de gêneros como *Pseudomonas*, *Salmonella* ou *Escherichia* (FOURNIER et al., 2006).

O problema mais grave no tratamento das bacteremias causadas por *A. baumannii* é a ineficiência dos diversos agentes antimicrobianos sobre este patógeno, limitando muito as opções de tratamento. Os carbapenêmicos, particularmente imipenem e meropenem, foram às drogas mais comumente escolhidas para tratamento de infecções causadas por *A. baumannii*, porém o elevado número de prescrições desta classe acarretou em um aumento do número de cepas multirresistentes aos carbapenêmicos. Em 2001, dados do SENTRY foram publicados, relatando que cepas provenientes de quatro estados brasileiros (São Paulo, Rio de Janeiro, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) no período de 1997 a 1999, apresentaram aproximadamente 10% de resistência aos carbapenêmicos, 35% à tetraciclina, 44% à tobramicina, 50% à

gentamicina e mais de 60% às cefalosporinas de terceira e quarta geração e as quinolonas (SADER et al., 2001). Gales e colaboradores, em 2006 publicaram dados deste mesmo programa, relatando as taxas de resistência de cepas isoladas da América Latina, 74,1% resistentes à ceftazidima, 11,3 % ao meropenem e 75% à piperacilina com tazobactam. Outro estudo realizado por Lee e colaboradores entre 2005 e 2007, na Coreia, demonstrou que existem algumas cepas resistentes a todos os agentes antimicrobianos e para as demais cepas os valores de resistência são muito elevados, sendo 67% dos isolados resistentes à fluorquinolonas, 48% resistentes à amicacina, 66% à ceftazidima e 51% ao imipenem.

Em nosso estudo, foram analisadas cepas coletadas no período de 2010 a 2011, sendo observado um aumento significativo de resistência aos diversos antimicrobianos, em relação ao estudo de Sader e colaboradores em 2001, como imipenem e meropenem (81,9%), ceftazidima (73,4%), cefepima (86,2%) e ciprofloxacino (89,4%), com resistência menos frequente à colistina (1,1%) e à amicacina (13,8%). É notável que as cepas de *A. baumannii* apresentaram um percentual de resistência mais elevado às diversas classes de antimicrobianos. Na presente pesquisa, 92,5% dos isolados foram classificados como MDR. Considerando que o percentual de resistência aos carbapenêmicos das cepas isoladas entre 1997 e 1999 no Brasil foi de 10%, neste estudo realizado com cepas de 2010 a 2011, o percentual de resistência ao imipenem e ao meropenem aumentou para 81,9%.

O agente imipenem é considerado mais potente no tratamento de infecções causadas por *A. baumannii* MDR do que meropenem. A resistência a meropenem está mais associada à expressão de bombas de efluxo, enquanto a expressão de enzimas oxacilinases à hidrólise de imipenem (IKONOMIDIS et al., 2006). No presente estudo a resistência às duas drogas foi na mesma proporção, não foi realizada técnicas que verificassem a expressão de bombas de efluxo, sendo executada apenas a detecção genotípica dos genes que codificam as enzimas oxacilinases.

Fica evidente que o uso racional de antimicrobianos é fundamental para evitar surtos de *A. baumannii* multirresistente. A emergência destas espécies normalmente está associada à pressão seletiva do uso prolongado de fluorquinolonas, carbapenêmicos e cefalosporinas de amplo espectro (MAK et al., 2009), restringindo cada vez mais as opções de tratamentos empíricos, limitando muitas vezes ao uso de antibióticos não mais utilizados, como polimixina B e polimixina E (colistina), que são antibióticos

sintéticos que apresentam efeitos colaterais nocivos aos pacientes, como ação nefrotóxica. O uso de associações de diferentes agentes antimicrobianos também está sendo realizado como colistina e rifampicina, imipenem e rifampicina, imipenem e tobramicina, tobramicina e rifampicina, na tentativa de cura dos pacientes, porém em muitos casos esgotam-se todas as opções de tratamento (MARAGAKIS; PERL, 2008).

As infecções causadas por *A. baumannii* estão associadas à morbidade e ao prolongamento do tempo de internação. Um estudo de coorte retrospectivo, envolvendo pacientes acometidos por bacteremias, demonstrou que pacientes infectados por *A. baumannii* ficaram cinco dias a mais internados em UTIs dependentes de ventilação mecânica, quando comparados a pacientes críticos não infectados por *A. baumannii* (BLOT; VANDEWOUDE; COLARDYN, 2003). Outro estudo avaliou que a internação de pacientes acometidos por *A. baumannii* em UTIs pode aumentar 6 dias, e que pacientes internados em outras unidade de tratamento tiveram um aumento de 18 dias no tempo de internação (SUNENSHINE et al., 2007).

A resistência de *A. baumannii* aos antimicrobianos acontece devido à combinação de diferentes mecanismos, como impermeabilidade da membrana celular, aumento da expressão de bombas de efluxo e produção de β -lactamases de vários tipos. Em relação às enzimas que afetam a atividade dos β -lactâmicos, há que se considerar a presença dos elementos genéticos chamados sequências de inserção (IS*Aba1* ou IS*Aba3*) que contribuem para a superexpressão de β -lactamases de *A. baumannii*, como cefalosporinases e oxacilinases (OXA-51-like ou OXA-58-like) (ZARRILLI et al., 2013), sendo que devido a sua grande versatilidade, a produção das carbapenemases se apresenta como principal preocupação, incluindo as serina oxacilinases (classe de D de Ambler) e as metalo- β -lactamases (QUEENAN; BUSH, 2007).

O primeiro relato de enzima tipo OXA com potente atividade carbapenemase ocorreu pela descrição de um plasmídeo contendo o gene *bla*_{oxa-23} em 1985. Esse gene tanto pode estar localizado no cromossoma ou em plasmídeos, e em associação com diferentes estruturas genéticas, sendo a mais frequente o transposson Tn2006 (MUGNIER et al., 2010). Atualmente, esse tipo de enzima contribui para a resistência de *A. baumannii* aos carbapenêmicos em muitos países (ZARRILLI et al., 2013).

Outros dois clusters de carbapenemases estão amplamente disseminados, incluindo os genes *bla*_{oxa-24-like} (OXA-24, -25, -26, -40 e -72) e *bla*_{oxa-58-like}. O grupo OXA-24-like compartilha 60% de homologia com os aminoácidos das enzimas OXA-

23-like. Os genes *bla*_{oxa-58-like}, identificados mais recentemente são frequentemente mediados por plasmídeos, e têm sido descritos causando surtos hospitalares em UTIs de todo o mundo. Esses genes são mais frequentemente detectados em isolados de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos, embora eles possam ser encontrados em isolados suscetíveis. O cluster de enzimas OXA-51 (OXA-51, -64, -65, -66, -68, -69, -70, -71, -78, -79, -80 e -82) difere dos outros tipos de carbapenemases, pois sua localização é cromossomal e inerentes a *A. baumannii*, sendo sua atividade dependente da presença de uma SI (ZARRILLI et al., 2013).

Nesse estudo o gene *bla*_{oxa-51} foi detectado nas espécies *A. baumannii* (93; 98,94%) e *A. nosocomialis* (2; 40%). O isolado de *A. pittii* não apresentou este gene codificador. Dos 94 isolados de *A. baumannii*, 89 (94,68%) apresentaram o gene *bla*_{oxa-23}, enquanto em *A. nosocomialis* o gene estava presente em 3 (60%) dos isolados. O gene estava presente no único isolado de *A. pittii*. De acordo com a pesquisa do gene referente à sequência de inserção *ISAbal*, todas os isolados de *A. baumannii* (94; 100%) apresentaram fragmentos amplificados compatíveis com a sequência, 4 (80%) isolados de *A. nosocomialis* e o único isolado *A. pittii* também foram positivos para *ISAbal*

Pelos resultados obtidos na pesquisa dos genes que conferem resistência aos agentes antimicrobianos e da sequência de inserção, foi possível detectar a ocorrência da presença simultânea dos dois genes codificadores de oxacilinas e a sequência de inserção em 94,7% (89) dos isolados de *A. baumannii*, e somente em uma cepa de *A. nosocomialis*. Dentre os demais isolados identificados como *A. nosocomialis* e *A. pittii* verificou-se a presença simultânea do gene da sequência de inserção com o gene *bla*_{oxa-23} em 2 (40%) espécies *A. nosocomialis* e na única cepa *A. pittii*.

A presença da sequência de inserção *ISAbal* em todas as espécies *A. baumannii* evidencia que a SI está amplamente difundida nesta espécie, porém determinar que a mesma seja exclusiva desta espécie, é contraditório, tendo em vista que neste estudo foi possível detectar esta sequência de inserção em quatro cepas de *A. nosocomialis* e em uma cepa de *A. pittii*.

O gene *bla*_{oxa-51} que codifica a oxacilinasase OXA-51, foi posteriormente considerado por alguns autores como gene intrínseco da espécie *A. baumannii*, porém outras espécies, *A. pittii* e *A. nosocomialis*, apresentaram esse gene na presente investigação.

As metalo- β -lactamases são menos comuns em *A. baumannii* do que as carbapenemases tipo OXA, porém sua atividade hidrolítica é 100-1000 vezes mais potente. A presença do gene em isolados de *A. baumannii* MDR é algumas vezes difícil de ser detectada (IKONOMIDIS et al., 2008), indicando que sua contribuição para a resistência aos carbapenêmicos deve ser subestimada. Estas enzimas hidrolisam todos os β -lactâmicos, incluindo os carbapenêmicos, porém não aztreonam. Três tipos de metalo- β -lactamases foram identificadas em *A. baumannii*, incluindo IMP, VIM E SIM (LEE et al., 2005, SADER et al., 2005, TSAKRIS et al., 2006, ZARRILLI et al., 2013).

Alguns estudos têm demonstrado a ocorrência de mais de uma enzima do tipo OXA adquirida em um mesmo isolado (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008; MENDES et al., 2009). Entretanto, a ocorrência de OXA-carbapenemases com MBL em *A. baumannii*, somente foi evidenciada em um único trabalho até o momento em Singapura (KOH et al., 2007).

No presente estudo não foram encontrados isolados que expressassem fenotipicamente MBL. Porém, foi possível verificar a importância entre a presença simultânea dos dois genes que expressam resistência aos carbapenêmicos e a sequência de inserção. Esta combinação pode ser um dos mecanismos de resistência mais importantes que a espécie *A. baumannii* apresenta, pois dentre os 94 isolados, em 89 esta combinação foi detectada e todas apresentaram perfil de multirresistência a vários agentes antimicrobianos, com MIC para os carbapenêmicos acima de 16 μ g/ml. O resultado sobre a presença dos dois genes *bla_{oxa-51}*, *bla_{oxa-23}* e da sequência *ISAbal* e o fenótipo MDR, a ocorrência concomitante das duas características, sugere que a possível presença do integron pode representar um importante marcador do fenótipo MDR, porém não são únicos responsáveis por tal fenótipo.

Os biocidas são amplamente usados na prática hospitalar, empregados para prevenir a disseminação de microrganismos patogênicos. Reduzida suscetibilidade aos biocidas em espécies bacterianas acontecem devido à determinantes genéticos intrínsecos e adquiridos (como os genes *qac*), porém o efluxo é considerado como o principal mecanismo de resistência. Alguns trabalhos relatam que tipicamente o gene *qacEAI*, codificador de uma bomba de efluxo SMR, é carregado por integrons de classe 1, junto com o gene de resistência a sulfonamida *sulI* (HOU et al., 2007, PÉRICHON et al., 2008, YIN et al., 2008, MAK et al., 2009, SAULE et al., 2013). A detecção do gene *qacEAI* através da PCR em *A. baumannii* já foi realizada, e foram encontradas

percentagens significativas da presença desse gene (80,6% de 31 isolados, 100% em 6 isolados e 41% em 86 isolados) (YIN et al., 2008, HOU et al., 2007, RAJAMOHAN; SRINIVASAN; GEBREYES, 2010).

A eficácia do desinfetante hospitalar para superfície fixa utilizado neste estudo foi comprovada por ensaio microbiológico (método da Diluição de Uso), sendo o produto capaz de eliminar todos os microrganismos testados (*S. aureus*, *P. aeruginosa* e *S. choleraesius*). O método da Diluição de Uso também foi realizado para os cinco isolados clínicos de *A. baumannii* em que foi detectada a presença do gene *qacEΔ1*. Foi usada a diluição do produto recomendada pelo fabricante de 1% e tempo de contato de 10 minutos. Os isolados clínicos SA/1, ST/6 e SUL/3 não apresentaram crescimento em nenhum dos 60 carreadores utilizados por ensaio, enquanto os isolados clínicos SC/11 e SS/9 apresentaram crescimento em apenas 1 cilindro. Assim, observamos a eficácia do produto e a suscetibilidade dos isolados clínicos frente à alta concentração de uso do produto.

Porém é fundamental que se pense que a diluição incorreta do produto ou mesmo a venda de produtos apresentando alteração do teor em relação ao declarado no rótulo, assim como o tempo de contato reduzido, poderiam levar à seleção de microrganismos menos suscetíveis aos desinfetantes, antissépticos ou drogas antimicrobianas.

A faixa de concentração inibitória mínima do desinfetante, que proporcionou ausência de crescimento dos isolados de *A. baumannii*, variou de 6 ppm a 14 ppm. Para os isolados *A. nosocomialis* e *A. pittii* esta concentração foi de 7 ppm e 6 ppm, respectivamente.

Os isolados clínicos nos quais foi detectada a presença do gene *qacEΔ1* foram isoladas em apenas um único hospital, em um período específico, junho a agosto de 2010, em diferentes sítios de coleta. Esses cinco isolados apresentaram todos os genes estudados, podendo-se inferir que possivelmente estejam presentes em um integron de classe I e são resistentes a todos os antimicrobianos, com exceção da colistina e amicacina.

A presença desse gene em *A. baumannii* pode refletir em adição a resistência ao amônio quaternário, a existência de um integron de classe I frequentemente associado com multirresistência. Os resultados de presença de elementos genéticos associados

com resistência a antimicrobianos e biocidas sugerem que tais elementos favoreçam a permanência em ambientes hospitalares e a disseminação de cepas multirresistentes.

Outro fator que faz desse patógeno um risco emergente é a sua habilidade de sobrevivência em superfícies inanimadas por longos períodos de tempo, contaminando facilmente o ambiente hospitalar e acarretando na sua transmissão entre os pacientes hospitalizados mediada pelos equipamentos médicos e pela equipe de saúde (BOU et al., 2013).

Em 2009, um estudo relatou um surto ocorrido em um Hospital Universitário da China em 2006, com contaminação de 2.500 leitos. Após este ocorrido, em 2008 construiu-se um novo hospital em outra região da cidade de Tawian, para evitar a contaminação de pacientes por *A. baumannii*, porém, após quatro meses da inauguração do novo hospital foram relatados novamente casos de pacientes acometidos por infecções secundárias ocasionadas por *A. baumannii*. A justificativa para este novo surto se deve ao fato de terem levado o mobiliário do antigo hospital para o novo, favorecendo o crescimento da espécie multirresistente e confirmando que são espécies que persistem vários meses em condições adversas ao crescimento de outros patógenos (HO et al., 2013).

Neste estudo, analisou-se a capacidade de sobrevivência em ambientes escassos de água de um único isolado de *A. baumannii*. O critério de escolha foi determinado pela presença de todos os genes em seu genoma pesquisados neste trabalho, ser um isolado MDR (com resistência a maioria dos agentes antimicrobianos) e ter apresentado concentração inibitória mínima acima de 10 ppm para o desinfetante hospitalar. Assim, foi escolhida o isolado SC/11 como padrão para realização deste estudo piloto. Observou-se a presença de crescimento bacteriano nos três tubos contendo os cilindros contaminados de cada ensaio em todos os dias estabelecidos, ou seja até 40° dia de incubação em ambiente escasso de água.

Devido ao fato de *A. baumannii* ser considerado um grande problema de saúde pública, faz-se necessária a combinação de esforços de equipes multidisciplinares para estudar este microrganismo, e que as mesmas possam estabelecer medidas de controle dos surtos ocasionados pelo mesmo, em diversos hospitais de várias regiões do mundo, pois as infecções ocasionadas por essa espécie aumentam a morbidade e mortalidade de pacientes internados, principalmente em UTIs (BOU et al., 2013).

As diferenças encontradas quanto à distribuição das espécies de relevância clínica assim como a suscetibilidade aos antimicrobianos e aos biocidas ressaltam a importância deste conhecimento, possibilitando compreender melhor a patogênese e permitindo a orientação de diretrizes do uso racional de antimicrobianos e desinfetantes hospitalares. O uso indiscriminado de antibióticos nas últimas décadas pode ser evidenciado neste estudo com a diminuição significativa da sensibilidade das cepas de *A. baumannii* aos carbapenêmicos (imipenem e meropenem) de 90% em 1999 para 18,1% em 2011, limitando as opções terapêuticas.

Um estudo realizado no Hospital Universitário da Ribeira, na Espanha, considera como medidas importantes o isolamento de pacientes, o aumento do quadro de funcionários, para minimizar a quantidade de pacientes por profissionais de saúde, a implantação da política de sempre lavar as mãos após contato com pacientes e higienizá-las com álcool após todas as lavagens. Essas medidas permitiram uma redução em 18 % do quadro de infecções causados por *A. baumannii* (BOU et al., 2013).

Um aspecto de grande importância no gerenciamento de surtos atribui-se às questões administrativas. Condições de trabalho adequadas, recursos humanos capacitados e qualificados, política de gerenciamento do uso racional de antimicrobianos, aos desinfetantes e antissépticos são essenciais para que medidas efetivas de controle de infecção possam ser implantadas com sucesso.

Nesta perspectiva, o presente estudo poderá contribuir de forma significativa para o aprimoramento das medidas de prevenção e controle das infecções causadas por *A. baumannii*. pois verificou-se neste estudo a urgência no controle dos isolados multirresistentes de *A. baumannii*, associado não somente à descoberta dos mecanismos de adaptação ligados à resistência às drogas antimicrobianas, aos desinfetantes e antissépticos, como também ao estudo de características fenotípicas e genotípicas que possam possibilitar a permanência e disseminação dessas bactérias em ambientes hospitalares

6 CONCLUSÕES

1. Isolados clínicos pertencentes ao gênero *Acinetobacter*, associados a infecções relacionadas à assistência à saúde foram identificados, prevalecendo a espécie *A. baumannii* (94, 94%), além de *A. pittii* (1, 1%) e *A. nosocomialis* (5, 5%).
2. Os principais sítios de isolamento foram: urina dos pacientes (19; 19%), secreção traqueal (19; 19%), sangue (16; 16%) e ponta de cateter intravascular (15; 15%).
3. Mesmo utilizando mais de um método de identificação fenotípica, a diferenciação das espécies bacterianas pertencentes ao complexo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* (ACB) só foi possível por metodologia genotípica, através de técnicas de amplificação de DNA por reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento de uma região específica do gene *rpoB*, denominada Zona 1.
4. A presença da sequência de inserção *ISAbal* e o do gene *bla_{OXA-51}* foi detectada não apenas nos isolados de *A. baumannii* como também em *A. pittii* (1, 1%) e *A. nosocomialis*, outras espécies pertencentes ao complexo ACB. A presença desse gene não pode ser considerada exclusividade da espécie *A. baumannii* e nem um marcador molecular para diferenciação das espécies pertencentes ao complexo ACB.
5. O perfil de multirresistência às drogas antimicrobianas e a presença de genes que codificam resistência aos carbapenêmicos foi observada na maioria dos isolados *A. baumannii* (87, 92,6%), o que pode estar relacionado com a transferência de genes de resistência no ambiente hospitalar.
6. Embora não tenha sido detectada a produção de enzima metalo- β -lactamases (MBL), todos os isolados de *A. baumannii* apresentaram perfil de resistência aos β -lactâmicos, podendo outros mecanismos de resistência estarem envolvidos.
7. O gene *bla_{OXA-23}* foi detectado em 89 (94,68%) isolados de *A. baumannii*, sugerindo que este seja o principal mecanismo de resistência aos carbapenêmicos, mas ainda assim em uma espécie sensível ao imipenem e ao meropenem foi possível a detecção deste gene.
8. Um isolado de *A. baumannii* apresentou resistência à colistina, alertando para o perigo da redução de opções de tratamento de infecções, já que hoje a colistina representa a última alternativa de tratamento para infecções causadas por *A. baumannii*.

9. O gene *qacEAI*, gene associado à resistência aos compostos quaternários de amônio (QACs), esteve presente apenas 5 isolados de *A. baumannii*.
10. Isolados que possuíam os genes *qacEAI*, apresentaram os maiores valores de CIM, mostrando uma menor susceptibilidade aos QACs, assim como perfil de MDR, com resistência a três ou mais classes de antibióticos, incluindo carbapenêmicos, β -lactâmicos, cefalosporinas (1^a, 2^a e 3^a geração), monobactâmicos, aminoglicosídeos (com exceção da amicacina) e quinolonas.
11. A análise do teor do tenso-ativo catiônico do produto desinfetante e a comprovação de sua eficácia revelaram que este produto está compatível com as exigências da legislação brasileira, e pode ser usado como uma das ferramentas de controle de desinfecção e eliminação de microrganismos patogênicos em ambientes hospitalares.
12. A análise da suscetibilidade à dessecação de um isolado de *A. baumannii* MDR, evidenciou a capacidade de sobrevivência desse isolado em condições totalmente adversas, em escassez de água, por pelo menos 40 dias de incubação, demonstrando a dificuldade de controle e eliminação desta espécie em ambientes hospitalares.

REFERÊNCIAS

AL-MASAUDI, S.B.; DAY, M.J.; RUSSEL A.D..Sensitivity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains to some antibiotics, antiseptics and disinfectants. *Journal of Applied Microbiology*. **J Appl Microbiol.**, v. 65, n. 4, p. 329-337, 1988.

AL-MASAUDI, S.B.; DAY, M.J.; RUSSEL, A.D. Antimicrobial resistance and gene transfer in *Staphylococcus aureus*. **J Appl Bacteriol.**, v.70, n. 4, p. 279 – 290, 1991.

ALTSCHUL, S.F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**, v. 25, n. 17, p. 3389-402, 1997.

ANSTEY, N.M. et al. Community-acquired bacteremic *Acinetobacter* pneumonia in tropical australia is caused by diverse strains of *Acinetobacter baumannii*, with carriage in the throat in at-risk groups. **J Clin Microbiol.**, v. 40, p. 685-686, 2002.

ANURADHA, S.; RATHI, M.R.; MATHUR, M.M. Mortality audit of neonatal sepsis secondary to *Acinetobacter*. **J Global Infect Dis.**, v. 5, n. 1, p. 3-7, 2013.

ARAKAWA, Y. et al. Convenient test for screening metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. **J Clin Microbiol.**, v. 38, n. 1, p. 40-3, 2000.

BAUMANN, P.; DOUDOROFF, M.; STANIER, R. Y. A study of the *Moraxella* Group II oxidative-negative species (Genus *Acinetobacter*). **J. Bacteriol.**, v. 95, n. 5, p. 1520-1541, 1968.

BENNETT, P. M. Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 43, n. 1, p. 1-4, 1999.

BERGOGNE-BÉRÉZIN, E.; TOWNER K.J. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical and epidemiological features. **Clinical Microbiol Rev.**, v. 9, n. 2, p. 148-165, 1996.

BLOT, S.; VANDEWOUDE, K.; COLARDYN, F. Nosocomial bacteremia involving *Acinetobacter baumannii* in critically ill patients: a matched cohort study. **Intensive Care Med.**, v.29, n.3, p. 471-5, 2003.

BHARGAVA, N.; SHARMA, P.; CAPALASH, N.. Quorum sensing in *Acinetobacter*: an emerging pathogen. **Crit Rev Microbiol.**, v. 36, n. 4, p. 349-360, 2010.

BOU, R. et al. Eradication of a nosocomial outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections after adjusting nursing workloads and reinforcing specific precautions. **Enferm. Infec. Microbiol. Clin.** 2013. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0213005X12004156>. Acesso em: 25 jun. 2013.

BOUVET, P.J.M.; GRIMONT, P.A.D. Taxonomy of the Genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. **IJSEM.**, v. 36, n. 2, p. 228-240, 1986.

BRADFORD, P.A. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clin Microbiol.**, v. 14, n. 4, p. 933-51, 2001.

BUSH, K. β -lactamase inhibitors from laboratory to clinic. **Clin Microbiol.**, v. 1, p. 109-123, 1988.

BUTLER, C.C. et al. Containing antibiotic resistance: decreased antibiotic-resistant coliform urinary tract infections with reduction in antibiotic prescribing by general practices. **Br J Gen Pract.**, v. 57, n. 543, p. 785-92, 2007.

BYUNG-CHAN, J. et al. Investigation of a nosocomial outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 β -lactamase in Korea. **J Clin Microbiol.**, v. 43, n. 5, p. 2241–2245, 2005.

CARVALHO, K.R. et al. Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying bla_{oxa-23} collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **Int J Antimicrob Agent.**, v. 34, n. 1, p. 25-28, 2009.

CATEL-FERREIRA, M. et al. Structure-function relationships of CarO, the carbapenem resistance-associated outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*. **J Antimicrob Chemother.**, v. 66, n. 9, p. 2053-6, 2011.

CHANG, H.C. et al. Species-level identification of isolates of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex by sequence analysis of the 16S-23S rRNA gene spacer region. **J Clin Microbiol.**, v. 43, p. 1632-1639, 2005.

CHO, Y.J. et al. Genetic basis of resistance to aminoglycosides in *Acinetobacter* spp. and spread of armA in *Acinetobacter baumannii* sequence group 1 in Korean hospitals. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v. 64, p. 185-90, 2009.

CHOI, C.H. et al. *Acinetobacter baumannii* invades epithelial cells and outer membrane protein A mediates interactions with epithelial cells. **BMC Microbiol.**, v. 8, p. 216, 2008.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI approved standard M100-S16. Wayne, Pennsylvania: **CLSI**, 2011.

COELHO, F. et al. Velhos problemas, novos desafios. **Revista Tecn. Hospitalar**, v. 43, p. 30-32, 2011.

DAI, N. et al. Drug-resistant genes carried by *Acinetobacter baumannii* isolated from patients with lower respiratory tract infection. **Chin Med J (Engl.)**, v. 123, n. 18, p. 2571-5, 2010.

DALLA-COSTA, L.M. et al. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. **J Clin Microbiol.**, v. 41, n. 7, p. 3403-06, 2003.

DAMIER-PIOLLE L et al. AdeIJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 52, p. 557-562, 2008.

DAVIS, K.A. et al. Multidrug-resistant *Acinetobacter* extremity infections in soldiers. **Emerg Infect Dis.**, v. 11, p. 12-18, 2005.

DIJKSHOORN, L. et al. Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis for identification of *Acinetobacter* genomic species. **Syst Appl Microbiol.**, v. 21, p. 33-39, 1998.

DIJKSHOORN, L.; NEMEC, A.; SEIFERT, H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Nat Rev Microbiol.**, n. 5, p. 939-951, 2007.

DJERIBI, R. et al. Characterization of bacterial biofilms formed on urinary catheters. **Am J Infect Control.**, v. 40, n. 9, p. 854-9, 2012.

DONALD, H. M. et al. Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA β -lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 44, p. 196–199, 2000.

DORSEY, C.W.; BEGLIN M.S.; ACTIS L.A. Detection and analysis of iron uptake components expressed by *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. **J Clin Microbiol.**, v. 41, p. 4188–93, 2003.

ERRIDGE, C. et al. *Acinetobacter baumannii* lipopolysaccharides are potent stimulators of human monocyte activation via Toll-like receptor 4 signalling. **J Med Microbiol.**, v. 56, p. 165–71, 2007.

ESPINAL, P.; MARTÍ, S.; VILA, J. Effect of biofilm formation on the survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. **J Hosp Infect.**, n. 80, n. 1, p. 56-60, 2012.

EUZÉBY, J.P. List of bacterial names with standing in nomenclature – Genus *Acinetobacter*. Société de bactériologie systématique et vétérinaire. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/a/acinetobacter.html>. Acesso em: 20 abr. 2013.

FALAGAS, M.E. et al. Pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* infections: characteristics and outcome in a series of 28 patients. **Int J Antimicrob Agents.**, v. 32, n. 5, p. 450-454, 2008.

FOURNIER, P. et al. Comparative Genomics of Multidrug Resistance in *Acinetobacter baumannii*. **PLoS Genet.**, v. 2, n.1, 2006.

GADDY, J.A.; TOMARAS, A.P.; ACTIS, L.A.. The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA protein plays a role in biofilm formation on abiotic surfaces and the interaction of this pathogen with eukaryotic cells. **Infect Immunity**, v. 77, p. 3150-3160, 2009.

GALES, A.C.; JONES, R.N.; SADER, H.S. Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54.731 clinical isolates of Gram-negative bacilli: report

from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2001-2004). **Clin Microbiol Infect.**, v. 12, p. 315-2, 2006.

GALES, A.C. et al. Emergence of an IMP-like metallo-enzyme in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain from a Brazilian teaching hospital. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v. 45, p. 77-9, 2003.

GARCÍA-ARATA, M.I.; GERNER-SMIDT, P.; LÓPEZ-BREA, M. Epidemiological study of *Acinetobacter* species isolated from an intensive care unit. **APMIS.**, v. 105, n. 2, p. 131-8, 1997.

GAYNES, R.; EDWARDS, J.R. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. **Clin Infect Dis.**, v. 41, n. 6, p. 848-54, 2005.

GERNER-SMIDT, P. Ribotyping of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* Complex. **J Clin Microbiol.**, v. 30, n. 10, p. 2680-2685, 1992.

GERNER-SMIDT, P.; TJERNBREG, I. *Acinetobacter* in Denmark: II. Molecular studies of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. **APMIS**, v. 101, p. 826-832, 1993.

GIAMARELLOU, H.; ANTONIADOU, A.; KANELLAKOPOULOU, K. *Acinetobacter baumannii*: a universal threat to public health? **Int J Antimicrob Agents.**, v. 32, n. 2, p. 106-19, 2008.

HARBOTTLE, H. et al. Genetics of Antimicrobial Resistance. **Anim. Biotechnol.**, v. 17, p. 111-124, 2006.

HEIR, E.; SUNDHEIM, G.; HOLCK, A.L. The *qacG* gene on plasmid pST94 confers resistance to quaternary ammonium compounds in staphylococci isolated from the food industry. **J Appl Microbiol.**, v. 86, n. 3, p. 378-388, 1999.

HÉRITIER, C. et al. Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 49, p. 4174-9, 2005.

HO, C-M. et al. Repeated colonization by multi-drug-resistant *Acinetobacter calcoaceticus*-*A. baumannii* complex and changes in antimicrobial susceptibilities in surgical intensive care units. **Surg Infect.**, v. 14, n. 1, p. 43-8, 2013.

HOU, T.W. et al. Microbiology and clinical analysis of six cases of hospital-acquired pneumonia caused by *Acinetobacter baumannii*. **Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi**, v. 30, n. 1, p. 35-9, 2007.

HOUANG, E.T.S. et al. Epidemiology and infection control implications of *Acinetobacter* spp. in Hong Kong. **J Clin Microbiol.**, v.39, n. 1, p. 228–234, 2001.

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

IBRAHIM, A; GERNER-SMIDT, P.; LIESACK, W. Phylogenetic relationship of the twenty-one DNA groups the genus *Acinetobacter* as revealed by 16s Ribosomal DNA sequence analysis. **Inter J. Syst Bacteriol.**, v. 47, n. 3, p. 837-841, 1997.

IKONOMIDIS, A. et al. Discordance of meropenem versus imipenem activity against *Acinetobacter baumannii*. **Int J Antimicrob Agents.**, v. 28, n. 4, p. 376-7, 2006.

IKONOMIDIS, A. et al. Hidden VIM-1 metallo- β -lactamase phenotypes among *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. **J Clin Microbiol.**, v. 46, n. 1, p. 346–349, 2008.

JANSSEN, P. et al. Discrimination of *Acinetobacter* genomic species by AFLP fingerprinting. **Int J Syst Bact.**, v. 47, n. 4, p. 1179-87, 1997.

JAWAD, A. et al. Comparison of ARDRA and recA-RFLP analysis for genomic species identification of *Acinetobacter* spp. **FEMS Microbiol Lett.**, v. 165, n.2, p. 357-62, 1988.

JEON, B.C. et al. Investigation of a nosocomial outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23. **J Clin Microbiol.**, v. 43, n.5, p. 2241-45, 2005.

JOLY-GUILLOU, M.L. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. **Clin Microbiol Infect.**, v. 11, p. 868–873, 2005.

KANAFANI, Z.A.; KANI, S.S. Clinical manifestations of *Acinetobacter* infection. 2008. Disponível em: <http://www.uptodate>. Acesso em: 10 jun. 2011.

KARLOWSKY, J.A. et al. Surveillance for antimicrobial susceptibility among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* from hospitalized patients in the United States, 1998 to 2001. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 47, n. 5, p. 1681-1688, 2003.

KOH, T.H. IMP-4 and OXA beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.55, p. 414-421, 2009.

KRAWCZYK, B.; LEWANDOWSKI, K.; KUR, J. Comparative studies of the *Acinetobacter* genus and the species identification method based on the *recA* sequences. **Mol Cell Probes.**, v. 16, n. 1, p. 1-11, 2002.

KÜCKEN, D.; FEUCHT H.; KAULFERS P. Association of *qacE* and *qacEΔ1* with multiple resistance to antibiotics and antiseptics in clinical isolates of Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiol Lett.**, v. 183, p. 95-98, 2000.

LA SCOLA, B. et al. Sequencing of the *rpob* gene and flanking spacers for molecular identification of *Acinetobacter* species. **J Clin Microbiol.**, v. 44, p. 827–832, 2006.

LEE, K et al. VIM- and IMP-type metallo-β-lactamase-producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. in Korean hospitals. **Emerg Infect Dis.**, v. 9, p. 868–71, 2003.

LEE, K. et al. High prevalence of ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* and increase of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. in Korea: a KONSAR program in 2004. **Yonsei Med J.**, v. 47, n.5, p. 634-45, 2006.

LEE, K. et al. Novel acquired metallo-β-lactamase gene, bla_{SIM-1}, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. **Antimicrob Agent Chemother.**, v. 49, n. 11, p. 4485-91, 2005.

LEE, K. et al. Increase of ceftazidime and fluorquinolone-resistant *Klebsiella pneumoniae* and imipenem-resistant *Acinetobacter* spp. in Korea: analysis of KONSAR study data from 2005 and 2007. **Yonsei Med J.**, v. 47, n.5, p. 634-45, 2006.

LIMA, A.L.; OLIVEIRA, P.R.; PAULA, A.P. *Acinetobacter* infection. **N Engl J Med.**, v. 358, n. 26, p. 2846-7, 2008.

LIVERMORE, D.M. β-Lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clin Microbiol Rev.**, v. 8, p. 557-84, 1995.

LOEHFELM, T. W.; LUKE, N. R.; CAMPAGNARI, A. A. Identification and characterization of an *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein. **J. Bacteriol.**, v. 190, n. 3, p. 1036-1044, 2008.

MANUAL DA QUALIDADE. MÉTODO DA DILUIÇÃO DE USO. Rev. 10. In: **MANUAL da Qualidade**. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2009. Seção 10.21 p. (65.3210.007 rev. 10).

MAK, J.K. et al. Antibiotic resistance determinants in nosocomial strains of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **J Antimicrob Chemother.**, v. 63, n. 1, p.47-54, 2009.

MARAGAKIS, L.L.; PERL, T.M. *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. **Clin Infect Dis.**, v. 46, p. 1254–1263, 2008.

MARTINS, A.F.; BARTH, A.L. Multidrug-resistant *Acinetobacter* – a challenge for public health. **Scientia Medica**, v. 23, n 1, p. 56-62, 2013.

MARTINS, A.F. et al. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme: dissemination in southern Brazil. **Infection**, v.37, p. 474-76, 2009.

MARTINS, N. et al. Severe infection in a lung transplant recipient caused by donor-transmitted carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Transpl Infect Dis.**, v. 14, n. 3, p. 316-20, 2012.

McDONNELL, G.; RUSSEL, A.D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. **Clin Microbiol Rev.**, v. 12, n. 1, p. 147-179, 1999.

McCONNELL, M.J. et al. Quantitative real-time PCR for detection of *Acinetobacter baumannii* colonization in the hospital environment. **J Clin Microbiol**, v. 50, p. 1412–1414, 2012.

MENDES, R.E. et al. Clonal dissemination of two clusters of *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 or OXA-58 in Rome, Italy. **Clin Microbiol Infect.**, v. 15, n. 6, p. 588-92, 2009.

MENDES, R.E. et al. Integron carrying a novel metallo-β-lactamase gene, bla_{IMP-16} and a fused form of aminoglycoside resistant gene aac(6′)-30/aac(6′)-Ib′: report from the

SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Antimicrob Agent Chemother.**, v. 48, n. 12, p. 4693-702, 2004.

MERIANOS, J.J. Surface-active agents. In: BLOCK, S.S. (Org.). **Desinfection, Sterilization and Preservation**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p. 283-320.

MUGNIER, P. D. et al. Worldwide Dissemination of the *bla*_{OXA-23} Carbapenemase Gene of *Acinetobacter baumannii*. **Emerg Infect Dis.**, v. 16, n. 1, p. 35-40, 2010.

MUGNIER, P.D. et al. Diversity of plasmid-mediated carbapenem-hydrolysing oxacillinases among carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Kingdom of Bahrain. **J Antimicrob Chemother.**, v. 63, n. 5, p. 1071-3, 2009.

MURRAY, P.R. et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 9. ed. Washington: ASM Press, 2007.

NEMEC, A. et al. Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus* -*Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). **Res Microbiol**, v. 162, p. 393-404, 2011.

NEMEC, A. et al. Diversity of aminoglycoside-resistance genes and their association with class 1 integrons among strains of pan-European *Acinetobacter baumannii* clones. **J Med Microbiol.**, v. 53, p. 1233-40, 2004.

NIU, C. et al. Isolation and characterization of an autoinducer synthase from *Acinetobacter baumannii*. **J. Bacteriol.**, v. 190, n. 9, p. 3386-3392, 2008.

NUCLEO, E. et al. Growth in glucose-based medium and exposure to subinhibitory concentrations of imipenem induce biofilm formation in a multidrug-resistant clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. **BMC Microbiol.**, v. 22, n. 9, p. 270, 2009.

PATON, R. et al. ARI 1: beta-lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Int J Antimicrob Agents.**, v. 2, n. 2, p. 81-87, 1993.

PELEG, A. Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D.L. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. **Clin Microbiol Rev.**, v. 21, n. 3, p. 538-82, 2008.

PÉRICHON, B. et al. Sequence of conjugative plasmid pIP1206 mediating resistance to aminoglycosides by 16S rRNA methylation and to hydrophilic fluoroquinolones by efflux. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 52, n. 7, p. 2581-92, 2008.

POIREL, L.; NORDMANN, P. Acquired carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases and their genetic support. **Curr Pharm Biotechnol.**, v. 3, p. 117-127, 2002.

POIREL, L.; NORDMANN, P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. **Clin Microbiol Infect.**, v. 12, p. 826–836, 2006.

QUEENAN, A.M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. **Clin Microbiol Rev.**, v. 20, n. 3, p. 440-58, 2007.

RECCHIA, G.D.; HALL, R.M. Plasmid evolution by acquisition of mobile gene cassettes: Plasmid pIE723 contains the *aadB* gene cassette precisely inserted at a secondary site in the IncQ plasmid RSF1010. **Molec.Microbiol.**, v. 15, p. 179-187, 1995.

RAJAMOCHAN, G.; SRINIVASAN, V.B.; GEBREYES, W.A. Molecular and functional characterization of a novel efflux pump, AmvA, mediating antimicrobial and disinfectant resistance in *Acinetobacter baumannii*. **J Antimicrob Chemother.**, v. 65, p. 1919–1925, 2010.

RICE, L.B. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: No ESKAPE. **J Infect Dis.**, v. 197, n. 8, p. 1079-1081, 2008.

ROMÃO, C. et al. Presence of *qacEΔ1* gene and susceptibility to a hospital biocide in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* resistant to antibiotics. **Curr Microbiol.**, v. 63, n. 1, p. 16-21, 2011.

ROMÃO, C.M. et al. Susceptibility of clinical isolates of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* to a hospital disinfectant and molecular typing. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v. 100, n. 5, p. 541-8, 2005.

ROMÃO, C.M.A. Desinfecção e esterilização química. In: TEIXEIRA, P., VALE, S. (Org.). **Biossegurança - Uma Abordagem Multidisciplinar**. 1. ed., Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1996. p. 133-162.

RUNNEGAR, N. et al. Molecular Epidemiology of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* in a Single Institution over a 10-Year Period. **J Clin Microbiol.**, v. 48, n. 11, p. 4051– 4056, 2010.

SADER, H.S. et al. Dissemination and diversity of metallo-beta-lactamases in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Int J Antimicrob Agents.**, v. 25, n. 1, p. 57-61, 2005.

SADER, H. et al. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from years of the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Braz J Infect Dis.**, v. 5, p. 200-14, 2001.

SANSCHAGRIN, F.; COUTURE, F.; LEVESQUE, R.C. Primary structure of OXA-3 and phylogeny of oxacillin-hydrolyzing class D beta-lactamases. **Antimicrob Agent Chemother.**, v.39, n. 4, p. 887-93, 1995.

SATO, K.; NAKAE, T. Outer membrane permeability of *Acinetobacter calcoaceticus* and its implication in antibiotic resistance. **J Antimicrob Chemother.**, v. 28, p. 35-45, 1991.

SAULE, M. et al. Dissemination of a carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strain belonging to international clone II/sequence type 2 and harboring a novel AbaR4-like resistance island in Latvia. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 57, n. 2, p.1069-72, 2013.

SEWARD, R.; LAMBERT, J.T.; TOWNER, K.J. Molecular epidemiology of aminoglycoside resistance in *Acinetobacter* spp. **J Med Microbiol.**, v. 47, p. 455-462, 1998.

SIDHU, M.S. et al. Frequency of disinfectant resistance genes and genetic linkage with β -lactamase transposon Tn552 among clinical staphylococci. **Antimicrob Agent Chemother.**, v. 46, n. 9, p. 2797-2803, 2002.

SMITH, A.W.; ALPAR, K.E. Immune response to *Acinetobacter calcoaceticus* infection in man. **J Med Microbiol.**, v. 34, p. 83-8, 1991.

STICKLER, D.J.; THOMAS, B. Antiseptic and antibiotic resistance in Gram-negative bacteria causing urinary tract infection. **J Clin Pathol.**, v. 33, n. 3, p. 288-296, 1980.

SUNENSHINE, R. H. et al. Multidrug-resistant *Acinetobacter* infection mortality rate and length of hospitalization. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 13, p. 97-103, 2007.

TOLEMAN, M.A.; JONES, R.N.; WALSH, T.R. Hospital outbreak of an imipenem-resistant VIM-2 encoding *Acinetobacter* DNA group 14TU strain in a German teaching hospital. **Clin Microbiol Infect.**, v. 10, n. 3, p. 48, 2004.

TOMASINO S. Disinfectants. In: Official Methods of Analysis. 18th ed. Revision 3, **Association of Official Analytical Chemists**, cap. 6, 2010.

TOWNER, K.J. Clinical importance and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp. Proceedings of a symposium held on 4-5 November 1996 at Eilat, Israel. **J Med Microbiol.**, v. 46, n. 9, p. 721-46, 1997.

TSAKRIS, A. et al. VIM-1 metallo-beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. **Emerg Infect Dis.**, v. 12, n. 6, p. 981-3, 2006.

TURTON, J.F. et al. The role of IS*Aba1* in expression of OXA-carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. **FEMS Microbiol Lett.**, v. 258, p. 72-7, 2006b.

TURTON, J.F. et al. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the blaOXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species. **J Clin Microbiol.**, v. 44, p. 2974-6, 2006a.

UROZ, S.; DESSAUX, Y.; OGER, P. Quorum sensing and quorum quenching: the yin and yang of bacterial communication. **Chem Bio Chem.**, v. 10, n. 2, p. 205-216, 2009.

VANEECHOUTTE, M. et al. Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. **J Clin Microbiol.**, v. 33, n. 1, p. 11-15, 1995.

WALSH, T.R. et al. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? **Clin Microbiol Rev.**, v. 18, p. 306-25, 2005.

WENDT, C. et al. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. **J Clin Microb.**, v. 35, n. 6, p. 1394-97, 1997.

WILLIAMS, J.D. β -lactamases and β -lactamase inhibitors. **Inter J Antimicrob Agent.**, v. 12, p. 3-7, 1999.

WROBLEWSKA, M.M. et al. Biofilm production by clinical strains of *Acinetobacter baumannii* isolated from patients hospitalized in two tertiary care hospitals. **FEMS Immunol Med Microbiol.**, v. 53, n. 1, p. 140-4, 2008.

YAMAMOTO, S.; BOUVET, P.J.; HARAYAMA, S. Phylogenetic structures of the genus *Acinetobacter* based on *gyrB* sequences: comparison with the grouping by DNA-DNA hybridization. **Int J Syst Bacteriol.**, v. 49, p. 87-95, 1999.

YAMAMOTO, S.; HARAYAMA, S. Phylogenetic analysis of *Acinetobacter* strains based on the nucleotide sequences of *gyrB* genes and on the amino acid sequences of their products. **Int J Syst Bacteriol.**, v. 46, n. 2, p. 506-11, 1996.

YAN, J.J. et al. Comparison of the double-disk, combined disk, and E-test methods for detecting metallo-beta-lactamases in Gram-negative bacilli. **Diag Microbiol Inf Dis.**, v. 49, n. 1, p. 5-11, 2004.

YIN, X.L. et al. Detection of drug resistance-associated genes of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Microb Drug Resist.**, v. 14, n. 2, p. 145-50, 2008.

ZARRILLI, R. et al. Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. **Int J Antimicrob Agents.**, v. 41, n. 1, p. 11-9, 2013.

ZARRILLI, R. et al. Molecular epidemiology of sequential outbreaks of *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit shows the emergence of carbapenem resistance. **J Clin Microbiol.**, v. 42, n. 3, p. 946-53, 2004.

ZAVASCKI, A.P. et al. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. **Expert Rev Anti Infect Ther.**, v. 8, n. 1, p. 71-93, 2010.

ZIMBLER, D. L. et al. Iron acquisition functions expressed by the human pathogen *Acinetobacter baumannii*. **Biometals**, v. 22, p. 23–32, 2009.

ZONG, Z. et al. J.An outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 carbapenemase in western China. **Int J Antimicrob Agent.**, v. 31, n. 1, p. 50-54, 2008.