



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

MAYRA MIOTO MATARUCO

**Perfil de suscetibilidade, genes de resistência aos aminoglicosídeos e
similaridade genética em amostras de *Acinetobacter baumannii* isoladas em
um Hospital Terciário**

**São José do Rio Preto
2015**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

MAYRA MIOTO MATARUCO

**Perfil de suscetibilidade, genes de resistência aos aminoglicosídeos e
similaridade genética em amostras de *Acinetobacter baumannii* isoladas em
um Hospital Terciário**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Mara Corrêa Lelles Nogueira

**São José do Rio Preto
2015**

Mataruco, Mayra Mioto.

Perfil de suscetibilidade, genes de resistência aos aminoglicosídeos e similaridade genética em amostras de *Acinetobacter baumannii* isoladas em um hospital terciário / Mayra Mioto Mataruco. -- São José do Rio Preto, 2015

84 f. : il., tabs.

Orientador: Mara Corrêa Lelles Nogueira

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia médica. 2. Agentes anti-infecciosos. 3. *Acinetobacter baumannii*. 4. Infecção hospitalar - São José do Rio Preto (SP)
5. Aminoglicosídeos. 6. Tipagem molecular. I. Nogueira, Mara Corrêa Lelles. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 576.8

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

MAYRA MIOTO MATARUCO

Perfil de suscetibilidade, genes de resistência aos aminoglicosídeos e similaridade genética em amostras de *Acinetobacter baumannii* isoladas em um Hospital Terciário

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Mara Corrêa Lelles Nogueira (Orientadora)
FAMERP – São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a. Alessandra Vidotto
FAMERP – São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a. Fátima Pereira de Souza
UNESP – São José do Rio Preto

**São José do Rio Preto
13 de Maio de 2015**

AGRADECIMENTOS

Ao iniciar uma caminhada, o ser humano nunca pode determinar se conseguirá atingir seus objetivos. Nesse caminhar, existem possibilidades de que ocorram tropeços, porém a grande virtude é a coragem para se levantar e começar novamente e nunca desistir.

Ao terminar uma jornada, não há prazer no mundo que possa ser comparado a este momento. Todas as dificuldades são esquecidas, mesmo que momentaneamente. Após a euforia, novas metas, novos objetivos são traçados e o ser humano recomeça sua caminhada.

Agradeço primeiramente à Deus pela vida, saúde e a luz no caminho, proporcionando as oportunidades necessárias ao meu desenvolvimento moral e intelectual. Também O agradeço por mudar as coisas, por nunca fazê-las da mesma forma, pois assim não teríamos o que questionar, pesquisar e descobrir.

Agradeço às pessoas que, direta ou indiretamente, ajudaram na elaboração deste trabalho:

À minha família, especialmente pais (Simone e João Luiz) e avós (Ivo, Dolores, Ângelo e Zilda) pelo amor, paciência, apoio, por me receberem de braços abertos desde que cheguei neste mundo e por sempre acreditarem em mim; e aos meus irmãos Thiago e Daniel por estarem junto comigo nesta caminhada.

Ao meu marido Eduardo, por tudo: amor, respeito, compreensão, auxílio e companheirismo em todas as horas. Sem sua ajuda teria sido mais difícil e não teria tanta força para ir até o fim.

Agradeço às duas excelentes instituições de ensino de São José do Rio Preto, seus diretores, docentes e funcionários: UNESP, especificamente ao IBILCE, e FAMERP, que me proporcionaram a estrutura física e condições para o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos meus companheiros de pesquisa, amigos e funcionários do Laboratório de Microbiologia (LM), Centro de Investigação de Microorganismos (CIM) e Laboratório de Pesquisa em Virologia (LPV) da FAMERP, pelo auxílio e apoio em todos os momentos. Gostaria de agradecer especialmente aos pesquisadores Margarete Teresa Gottardo de Almeida, Carlos Eugênio Cavasini e Maurício Lacerda Nogueira, dos respectivos laboratórios acima citados, pelos recursos materiais essenciais para a realização deste trabalho.

Aos meus companheiros de trabalho e amigos do Laboratório de Marcadores Moleculares e Bioinformática Médica (LMMBM), especialmente à minha chefe Prof^a. Eloiza

H. Tajara da Silva, pela receptividade, compreensão e auxílio na análise estatística do presente trabalho.

À minha orientadora, Prof^a. Mara, pela paciência, apoio, ensinamentos, elogios, sugestões e críticas que me fizeram amadurecer pessoalmente e profissionalmente. Agradeço muito pelos valiosos conselhos de seguir em frente e aproveitar as oportunidades que a vida nos oferece.

“Cada pessoa é aquilo que crê, fala do que gosta, retém o que procura,
ensina o que aprende, tem o que dá e vale o que faz.”
(Francisco Cândido Xavier)

RESUMO

Acinetobacter baumannii é frequentemente encontrado em infecções hospitalares, ocasionando pneumonia associada à ventilação, bacteremia, infecções de trato urinário e meningite secundária. Nos últimos anos, o uso extensivo de antimicrobianos em hospitais contribuiu para o aumento e emergência de cepas resistentes, incluindo os carbapenêmicos, os principais recomendados no tratamento. Assim, os aminoglicosídeos ganham importância como opção terapêutica. A resistência a estes antimicrobianos é decorrente, principalmente, da produção de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AMEs) e de enzimas 16S rRNA Metilases. No Brasil, informações sobre o perfil de suscetibilidade e genes que codificam estas enzimas são escassas. Assim, é fundamental a identificação de mecanismos de resistência e reservatórios potenciais, bem como realizar comparação de isolados para controlar a disseminação de *A. baumannii* no ambiente hospitalar. O presente estudo teve como objetivos avaliar e comparar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos, genes de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AMEs), genes de enzimas 16S rRNA Metilases e similaridade genética entre isolados de *A. baumannii* com importância clínica no Hospital de Base (HB) de São José do Rio Preto, SP. Além disso, estes resultados foram comparados com um estudo anterior realizado no mesmo hospital. Foram avaliados 32 isolados coletados no período entre dezembro de 2013 a maio de 2014. A identificação da espécie foi realizada por metodologias automatizadas e confirmada por Duplex-PCR. Os testes de suscetibilidade aos antimicrobianos foram resultantes de teste automatizado de microdiluição e disco-difusão, para aminoglicosídeos Amicacina (AK), Gentamicina (CN), Tobramicina (TOB) e Canamicina (CAN), de acordo com o CLSI, 2014 e FDA, 2013. *Primers* específicos e PCR-multiplex foram usados para a detecção dos genes de AMEs, 16S rRNA Metilases e os *primers* REP1 e REP2 para a tipagem molecular por REP-PCR. Todos os isolados do presente estudo foram confirmados como *A. baumannii*. Dezesseis perfis de resistência foram observados, sendo os antimicrobianos Ceftriaxona (CRO), Ceftazidima (CAZ), Cefepime (FEP), Imipenem (IPM), Meropenem (MEM), Piperacilina/Tazobactam (TZP) e Ciprofloxacina (CIP) com maior porcentagem de isolados não-suscetíveis. As metodologias de microdiluição e disco-difusão não apresentaram diferenças significantes para os aminoglicosídeos AK e CN, comprovando que ambas podem ser utilizadas. Em 28 isolados foi detectado pelo menos um gene de AMEs, entre estes, o mais frequente foi *aph(3')-VI* (53,1%). Há correspondência significativa entre os genes de AMEs *aac(6')-Ib* e o fenótipo de resistência a AK/TOB e *aac(3)-Ia* e resistência a CN, sugerindo que estes genes estão expressos. Já a tipagem molecular mostrou a ocorrência de 8 *clusters* amplamente disseminados nas UTIs da instituição. A comparação entre o atual trabalho e o estudo anterior revelou um aumento nas taxas de resistência à AK, CN, Ampicilina/Sulbactam (SAM) e Tigeciclina (TIG). As frequências de alguns genes de AMEs foram alteradas, mas as dos genótipos permanecem semelhantes nos dois estudos. A tipagem molecular mostrou a disseminação de *A. baumannii* em UTIs e sua transmissão horizontal nos dois estudos, em períodos distintos. Estes dados evidenciam a elevada capacidade de adaptação de *A. baumannii* e importância de estudos consecutivos no monitoramento das taxas de resistência aos antimicrobianos, visando a adoção de medidas de precaução apropriadas.

Palavras-chave: *Acinetobacter baumannii*. Infecções nosocomiais. Resistência a antimicrobianos. AMEs. Tipagem molecular.

SUMMARY

Acinetobacter baumannii is found in nosocomial infections, causing ventilator-associated pneumonia, bacteremia, urinary tract infections and secondary meningitis. In recent years, the extensive use of antibiotics in hospitals has contributed to the rise and emergence of *A. baumannii* strains resistant to a wide range of antimicrobials, including carbapenems, main antibiotics recommended on treatment. In this context, aminoglycosides gain importance as therapeutic options. Resistance to aminoglycosides is mainly due to the Aminoglycoside Modifying Enzymes (AMEs) and 16S rRNA Methylases production. In Brazil, high infection rates to carbapenem-resistant *A. baumannii* are observed, however information about aminoglycoside susceptibility profile and occurrence of these genes are scarce. Thus, it is essential to identify resistance mechanisms and potential reservoirs, as well as perform comparison of isolates to control the spread of *A. baumannii* in the hospital environment. This study aimed to evaluate and compare the antimicrobial susceptibility profile, genes of aminoglycoside modifying enzymes and 16S rRNA Methylases and genetic similarity among *A. baumannii* isolates with clinical importance at Hospital de Base (HB) in São José do Rio Preto, SP. Additionally, the results were compared to another previous study achieved in the same hospital. 32 isolates collected between December 2013 and May 2014 were evaluated. Species identification was performed using automated methodology and confirmed by Duplex-PCR. The susceptibility tests were the result of automated and disc-diffusion tests - for aminoglycosides Amikacin (AK), Gentamicin (CN), Tobramycin (TOB) and Kanamycin (K) - according to CLSI, 2014 and FDA, 2013. Specific primers and Multiplex-PCR were used in AMEs' and 16S rRNA Methylases' genes detection and primers REP1-REP2 were used in molecular typing by REP-PCR. All the isolates of this study were confirmed as *A. baumannii*. Sixteen resistance profiles were observed, the antibiotics Ceftriaxone (CRO), Ceftazidime (CAZ), Cefepime (FEP), Imipenem (IPM), Meropenem (MEM), Piperacilin/Tazobactam (TZP) and Ciprofloxacin (CIP) presented the highest percentual of non-susceptible isolates. Microdilution and disc-diffusion methodologies showed no significant difference for aminoglycosides AK and CN, proving both can be used. In 28 isolates at least one AME gene was detected, among them, the most frequent was *aph(3')-VI* (53,1%). There is significant correspondence between the AMEs' genes *aac(6')-Ib* and the resistance phenotype to AK/TOB and *aac(3)-Ia* and the resistance phenotype to CN, suggesting these genes are expressed. Molecular typing showed 8 clusters widely disseminated in the ICUs of the institution. Comparison between this study and the previous revealed growth on resistance frequencies to AK, CN, Ampicilin/Sulbactam (SAM) and Tigeciclin (TIG). Frequencies of some AMEs' genes have changed but the ones for AMEs' genotypes remain similar in both studies. Molecular typing showed *A. baumannii* dissemination in ICUs and its horizontal transmission in both studies during different periods. These data demonstrate the high adaptability of *A. baumannii* and importance of consecutive studies in monitoring antimicrobial resistance rates in order to take appropriate precautionary measures.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*. Nosocomial infections. Antimicrobial resistance. AMEs. Molecular typing.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Distribuição dos percentuais de isolados clínicos de *A. baumannii* por material biológico. 42
- Figura 2** - Distribuição dos 32 isolados do estudo nas diferentes Unidades de Internação do HB. 44
- Figura 3** - Imagem do gel de agarose a 1%, resultante de eletroforese mostrando o produto de amplificação dos genes da região ITS específica da espécie *A. baumannii* (208 pb) e da região do gene *recA* presente em todo o gênero *Acinetobacter* spp. (425 pb). 45
- Figura 4** - Perfil qualitativo geral de suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *A. baumannii* do estudo. 47
- Figura 5** - Perfil qualitativo de suscetibilidade aos aminoglicosídeos elaborado a partir dos resultados do método de disco-difusão. 51
- Figura 6** - Imagem do gel de agarose a 1%, resultante de eletroforese mostrando os produtos de amplificação dos genes de AMEs. 56
- Figura 7** - Frequência de isolados de *A. baumannii* carreadores de genes de AMEs. 57
- Figura 8** - Frequência de isolados de *A. baumannii* carreadores de diferentes combinações de AMEs. 57
- Figura 9** - Imagem do gel amostral de agarose a 1%, resultante de eletroforese mostrando o resultado da PCR para as 16S rRNA Metiltransferases. 62
- Figura 10** - Imagem do gel de agarose a 1,5%, resultante de eletroforese mostrando o resultado da tipagem molecular dos isolados de *A. baumannii* por meio da técnica de REP-PCR. 63
- Figura 11** - Dendrograma com os perfis de REP-PCR de 31 isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii*. 63
- Figura 12** - Dendrograma com perfis de REP-PCR de 31 isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* de 2014 e 8 isolados de dezembro de 2012. 70

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1 - Resumo das características dos isolados clínicos de <i>A. baumannii</i> deste estudo.	30
Quadro 2 - Padrões de interpretação de valores de CIM para <i>Acinetobacter</i> spp., segundo CLSI, 2014 e FDA, 2013.	32
Quadro 3 - Padrões de interpretação de valores de diâmetro do halo de inibição (mm) para <i>Acinetobacter</i> spp., segundo CLSI, 2014.	33
Quadro 4 - Protocolo da reação de PCR para identificação de <i>A. baumannii</i> .	35
Quadro 5 - Protocolo das reações Triplex 1 e Triplex 2 para AMEs.	37
Quadro 6 - Protocolo da reação Duplex para AMEs.	37
Quadro 7 - Protocolo da reação multiplex para <i>armA</i> , <i>rmtB</i> e <i>rmtC</i> .	38
Quadro 8 - Protocolo da tipagem molecular por REP-PCR.	39
Quadro 9 - <i>Primers</i> utilizados nas reações de PCR para a identificação de <i>A. baumannii</i> , investigação de genes de AMEs, 16S rRNA Metiltransferases e tipagem molecular por REP-PCR.	41
Tabela 1 - Perfil quantitativo de suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados de <i>A. baumannii</i> do estudo.	46
Tabela 2 - Perfil quantitativo de suscetibilidade aos aminoglicosídeos com os valores de CIM (µg/mL) e de diâmetro do halo (mm) para os isolados de <i>A. baumannii</i> deste estudo.	50
Quadro 10 - Resumo do perfil de resistência de <i>A. baumannii</i> deste estudo.	53
Tabela 3 - Distribuição de genes de resistência aos aminoglicosídeos e seus respectivos fenótipos de suscetibilidade à Amicacina, Gentamicina, Tobramicina e Canamicina.	59
Tabela 4 - Frequência de genes de AMEs, especificidade de substratos das enzimas e valores de <i>p</i> obtidos para os aminoglicosídeos Amicacina, Gentamicina, Tobramicina e Canamicina.	60
Quadro 11 - Resumo das características dos isolados de <i>Acinetobacter baumannii</i> de acordo com o agrupamento do dendrograma de REP-PCR (Figura 11).	65
Quadro 12 - Resumo das características dos isolados de <i>Acinetobacter baumannii</i> : perfil de suscetibilidade aos aminoglicosídeos por disco-difusão e microdiluição, perfil de AMEs e grupo/ <i>cluster</i> .	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	– Graus Celsius
G	– Força Gravitacional
g	– Gramas
gen.sp.	– Genoespécie
Kb	– Kilobases
µg	– Microgramas
µL	– Microlitros
µM	– Micromolar
mg	– Miligrama
Mg ²⁺	– Magnésio
MgCl ₂	– Cloreto de Magnésio
mL	– Mililitros
mM	– Milimolar
ng	– Nanogramas
pb	– Pares de Bases
pH	– Potencial Hidrogeniônico
pmol	– Picomol
U	– Unidade
V/cm	– Volts por Centímetro
X	– Quantidade de vezes que uma solução está concentrada em relação à concentração final
AACs	– Acetiltransferases
AFLP	– <i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> (Polimorfismo de Tamanho de Fragmento Amplificado)
AMEs	– <i>Aminoglycoside Modifying Enzymes</i> (Enzimas Modificadoras de Aminoglicosídeos)
ANTs	– Nucleotidiltransferases
APHs	– Fosfotransferases
ATCC	– <i>American Type Culture Collection</i> (Coleção de Cultura do Tipo Americana)
ATP	– Adenosina Trifosfato
AK	– Amicacina
BGNF	– Bacilos Gram-negativos Não-fermentadores
CAN	– Canamicina
CAZ	– Ceftazidima

CDC – *Centers for Disease Control and Prevention* (Centros para o Controle e Prevenção de Doenças)

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CIP – Ciprofloxacina

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute* (Instituto de Padronização Clínica e Laboratorial)

CN – Gentamicina

COL – Colistina

CRO - Ceftriaxona

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DRS – Divisão Regional de Saúde

dNTP – Deoxynucleosidetriphosphate

ESBL – *Extended-spectrum beta-lactamase* (Beta Lactamase de Espectro Estendido)

F – *Forward primer*

FAMERP – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

FDA – *US Food and Drug Administration* (Administração de Alimentos e Drogas dos Estados Unidos)

FEP --Cefepime

GTP – Guanosina Trifosfato

HB – Hospital de Base

I – Isolado com Resistência Intermediária

IPM – Imipenem

IRAS – Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde

MEM – Meropenem

MLST – *Multilocus Sequencing Typing* (Tipagem Sequencial por Múltiplos Locus)

PAV – Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica

PCR – *Polymerase chain reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

PFGE – *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (Eletroforese em Gel de Campo Pulsado)

PB – Polimixina B

q.s.p. – Quantidade suficiente para atingir um determinado volume

R – Isolado Resistente

R – *Reverse primer*

REP – *Repetitive Extragenic Palindromic* (Repetição Palindômica Extragênica)

RNA – Ácido Ribonucleico

RNAse – Enzima que degrada Ácido Ribonucleico

rRNA – RNA Ribossômico

S – Isolado Sensível

SAM – Ampicilina/Sulbactam

SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SUS – Sistema Único de Saúde

TE – Tris EDTA

TIG – Tigeciclina

TOB - Tobramicina

TSA – Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos

TSB – *Trypsin Soy Broth* (Caldo Tripsina de Soja)

TZP – Piperacilina Tazobactam

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

UPGMA – *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (Método de Grupo Pareado sem Peso com Média Aritimética)

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
1.1. Gênero <i>Acinetobacter</i> e suas Espécies.....	16
1.2. <i>Acinetobacter baumannii</i> e as Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde.....	18
1.3. Tratamento de Infecções por <i>A. baumannii</i> – Importância dos Aminoglicosídeos	19
1.4. Resistência aos Aminoglicosídeos em <i>Acinetobacter baumannii</i>	20
1.4.1. Enzimas Modificadoras de Aminoglicosídeos (AMEs).....	20
1.4.2. Enzimas 16S rRNA Metilases.....	22
1.5. Tipagem Molecular de <i>A. baumannii</i>	23
2. JUSTIFICATIVA	25
3. OBJETIVOS	27
3.1. Objetivo Geral.....	27
3.2. Objetivos Específicos.....	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1. Seleção dos Isolados	29
4.2. Identificação e Determinação do Perfil de Suscetibilidade aos Antimicrobianos	31
4.3. Armazenamento e Manutenção dos Isolados.....	34
4.4. Extração de DNA Genômico Bacteriano	34
4.5. Identificação das Espécies de <i>Acinetobacter baumannii</i> através de Duplex-PCR	35
4.6. Investigação de Genes de Enzimas Modificadoras de Aminoglicosídeos (AMEs).....	36
4.7. Investigação de Genes de Enzimas 16S rRNA Metiltransferases	38
4.8. Tipagem Molecular dos Isolados de <i>A. baumannii</i> por REP-PCR	39
4.9. Cálculo do Teste Exato de Fisher	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1. Perfil Clínico-Epidemiológico dos Isolados de <i>A. baumannii</i>	42
5.2. Identificação de <i>Acinetobacter baumannii</i>	45
5.3. Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos	45
5.3.1. Perfil Geral de Suscetibilidade.....	45
5.3.2. Perfil de Suscetibilidade aos Aminoglicosídeos	49
5.3.3. Perfil de Resistência aos Antimicrobianos.....	53
5.3.4. Comparação das Suscetibilidades aos Antimicrobianos apresentadas por Isolados de 2012 e 2014	54
5.4. Investigação de Genes de AMEs	55

5.4.1. Frequência de Genes e Genótipos de AMEs.....	55
5.4.2. Verificação da Correspondência da Presença de Genes AMEs e Resistência Fenotípica aos Aminoglicosídeos	59
5.4.3. Comparação da Investigação de Genes de AMEs de Isolados de 2012 e 2014.....	61
5.5. Investigação de Genes de Enzimas 16S rRNA Metiltransferases	62
5.6. Tipagem Molecular de <i>A. baumannii</i>	62
5.6.1. Tipagem Molecular de <i>A. baumannii</i> em Isolados do Presente Estudo.....	62
5.6.2. Comparação da Tipagem Molecular de <i>A. baumannii</i> em Isolados de 2012 e 2014.....	70
6. CONCLUSÕES	72
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Gênero *Acinetobacter* e suas Espécies

O gênero *Acinetobacter* engloba cocobacilos Gram-negativos, aeróbios estritos, não-fermentadores, não-fastidiosos, imóveis, catalase-positivos e oxidase-negativos, com dimensões que variam entre 1-1,5 μm de diâmetro e 1,5-2,5 μm de comprimento (GIAMARELLOU; ANTONIADOU; KANELLAKOPOULOU et. al., 2008; FOURNIER; RICHET, 2006; PELEG et. al., 2008). Nos dados taxonômicos recentes, os membros deste gênero são classificados na nova família Moraxellaceae, na classe Gammaproteobacteria, cujos principais gêneros são *Moraxella*, *Acinetobacter* e *Psychrobacter* (BOU et al., 2000; HOWARD et al., 2012; PELEG et al., 2008).

Este micro-organismo foi isolado e descrito pela primeira vez em 1911, por um microbiologista holandês, a partir do solo, sendo denominado *Micrococcus calcoaceticus* (MANCHANDA; SANCHAITA; SINGH 2010). Após 43 anos, Brisou e Prevot (1954) instituíram a nomenclatura *Acinetobacter* (do grego “*akinetos*”, que significa não-móvel). Entretanto, somente em 1971, a existência do gênero *Acinetobacter* foi aceita pelo subcomitê de taxonomia da Família Moraxellaceae, que considerou os resultados da publicação de Baumann e colaboradores (1968).

Quarenta e uma espécies de *Acinetobacter* já foram descritas até o momento (<http://www.bacterio.cict.fr/a/acinetobacter.html> acesso em 14/05/2015). A identificação por meio de testes fenotípicos das espécies de *Acinetobacter* foi proposta por Bouvet e Grimont em 1986. Entretanto, este sistema, eficiente para a diferenciação da maioria das espécies, não é apropriado para a identificação de *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *Acinetobacter* gen.sp.3 (atualmente denominado *Acinetobacter pittii*) e *Acinetobacter* gen.sp.13TU (atualmente denominado *A. nosocomialis*) (NEMEC et. al., 2011). Devido à alta similaridade genética, estas espécies foram agrupadas em um complexo denominado *Acinetobacter baumannii* - *Acinetobacter calcoaceticus* (complexo ACB) (GERNER-SMIDT; TJERNBERG; URSING, 1991).

Na última década vários métodos foram desenvolvidos para a identificação das espécies do complexo ACB, sendo estes baseados na diferenciação de características genéticas por técnicas como o *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP), *Multilocus Sequencing Typing* (MLST) (ALMEIDA; ARAÚJO, 2013) e, para *A. baumannii*, a

Polymarase Chain Reaction (PCR) específica para a detecção de um fragmento (208 pb) da subunidade 16S do RNA ribossômico (CHEN et al., 2007).

Embora o gênero *Acinetobacter* ocorra amplamente em ambientes naturais, sendo organismos endógenos em solos, água e, ocasionalmente, encontrados em alimentos e animais (FERREIRA et al., 2011), nem todas as espécies deste gênero tem o meio ambiente como seu hábitat natural (HOWARD et al., 2012; PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008). Exemplos disso são *A. calcoaceticus*, que é encontrado em água, solo e vegetais, enquanto *Acinetobacter pittii* também é encontrado nestes ambientes e na pele humana. *A. baumannii* normalmente habita o solo, pele humana e membranas mucosas (MANCHANDA; SANCHAITA; SINGH 2010). *A. lwoffii* e *A. radioresistens* também fazem parte da microbiota da pele (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008). *A. baumannii*, *A. nosocomialis* e *Acinetobacter pittii* são as espécies mais frequentes encontradas em amostras clínicas humanas (DIJKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007).

Em humanos, *Acinetobacter* spp. tem sido isolado de vários sítios do corpo, como parte da microbiota da pele, principalmente em regiões mais úmidas, como axila, virilha e entre os dedos dos pés. Cerca de 43% dos adultos saudáveis apresentam a colonização da pele e membranas mucosas, enquanto pacientes hospitalizados apresentam taxa de 75% para colonização da pele por *Acinetobacter* spp. Além disso, entre os trabalhadores hospitalares e pacientes as taxas de colonização são ainda maiores. As espécies mais frequentemente isoladas nestes estudos foram *A. lwoffii* (58%), *A. johnsonii* (20%), *A. junii* (10%) e *Acinetobacter pittii* (6%) (MANCHANDA; SANCHAITA; SINGH, 2010; PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008; SEIFERT et al., 1997).

A. baumannii pode sobreviver por longos períodos em superfícies secas e úmidas (FERREIRA et al., 2011; MANCHANDA; SANCHAITA; SINGH, 2010; MORTENSEN; SCAAR, 2012). Este micro-organismo possui a habilidade de aderir, colonizar e invadir células epiteliais humanas, inclusive em indivíduos saudáveis. Além disso, adquirem por transferência horizontal uma grande diversidade de genes de resistência a antimicrobianos e de virulência, que lhes conferem a capacidade de resistir ao tratamento, e de formação de biofilmes e resistência à dessecação (BROSSARD; CAMPAGNARI, 2012; LEE et. al., 2008; ZARRILLI et. al., 2013).

Sua habilidade em formar biofilmes em superfícies abióticas, como cateteres, aparelhos de ventilação e outros aparelhos médicos, favorece a transmissão horizontal (MORTENSEN; SCAAR, 2012). Thom e colaboradores (2011) demonstraram a contaminação por *A. baumannii* multirresistente em bombas de infusão, painéis de aparelhos e

grades de cama, que são sítios comumente tocados por médicos e enfermeiros durante cuidados de rotina. Além disso, neste mesmo estudo, em 85% dos casos o isolado ambiental foi geneticamente semelhante ao isolado do paciente, demonstrando que pacientes colonizados com *A. baumannii* podem ser uma fonte de contaminação ambiental e vice-versa. Além disso, *A. baumannii* pode ser disseminado pelo ar a curtas distâncias, por meio de gotículas de água e escamas de pele de pacientes colonizados, que podem carregar o microrganismo por um período de dias a semanas. Estas características elevam a incidência de infecções por este patógeno (DIJKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007; FERREIRA et al., 2011; MANCHANDA; SANCHAITA; SINGH, 2010).

1.2. *Acinetobacter baumannii* e as Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde

Acinetobacter spp. são importantes patógenos oportunistas, que promovem infecção dos tratos respiratório e urinário, corrente sanguínea, sistema nervoso central, feridas e queimaduras. Entre todas as espécies, *A. baumannii* é a mais frequentemente identificada como agente de infecções em pacientes hospitalizados (HOWARD et al., 2012; XU et al., 2013).

Diversos estudos descrevem os fatores de risco para a colonização e infecção por *A. baumannii*. Pacientes debilitados admitidos em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs), principalmente os submetidos à ventilação mecânica, encontram-se em maior risco (WANG et al., 2007; ASADOLLAHI et al., 2012; KARAGEORGOPOULOS; FALAGAS, 2008; MAMMINA et al., 2012). Além disso, cirurgias extensas e grandes traumas, nascimento prematuro, hospitalização precedente, longos períodos de internação, utilização de instrumentos invasivos (como cateteres intravasculares, urinários e tubos de drenagem), quantidade de procedimentos invasivos e terapia antimicrobiana prévia são importantes fatores de risco (DIJKSHOORN et al., 2005; KARAGEORGOPOULOS; FALAGAS, 2008; PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008; VISCA; SEIFERT; TOWNER, 2011).

Em pacientes admitidos em UTIs, as infecções mais comuns por *A. baumannii* são a pneumonia associada à ventilação (PAV) e a infecção de corrente sanguínea, relacionadas a consideráveis índices de morbidade e mortalidade, que podem ser superiores a 52% (DIJKSHOORN et al., 2005; PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008). A PAV, definida como infecção pulmonar que se desenvolve após 48 horas de intubação endotraqueal, é o tipo de infecção mais frequente em UTIs, com taxas que variam de 10 a 65% (BOWTON et al.,

2013; TEJERINA et. al., 2006). As infecções da corrente sanguínea de origem nosocomial são confirmadas após o isolamento de um ou mais micro-organismos após 24 horas de admissão hospitalar na presença de sintomas típicos de infecção (AL MOHAJER; DAROUICHE, 2012). Curiosamente, quando se comparam bacteremias causadas por *A. baumannii* e outros organismos Gram-negativos, o primeiro caso apresenta mortalidade mais elevada (VISCA; SEIFERT; TOWNER, 2011). Estudos relatam os fatores de risco de infecção de corrente sanguínea por *A. baumannii*, como tempo de internação prolongado, utilização prévia de antimicrobianos, granulocitopenia, quimioterapia, queimaduras, infecções em diferentes sítios, ventilação mecânica, colonização prévia e presença de dispositivos intravasculares (AL MOHAJER; DAROUICHE, 2012; BEEKMANN; HENDERSON, 2010).

1.3. Tratamento de Infecções por *A. baumannii* – Importância dos Aminoglicosídeos

No ambiente hospitalar, o tratamento de infecções por *Acinetobacter baumannii* é realizado, principalmente, com beta-lactâmicos, sendo os carbapenêmicos imipenem e meropenem os mais prescritos para o tratamento de infecções graves por cepas multirresistentes (JEAN et. al., 2013; PAPP-WALLACE et. al., 2011; SHAH; ISAACS, 2003). Entretanto, devido à ampla utilização, a frequência de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos tem aumentado consideravelmente (IKONOMIDIS et. al., 2006; NORSKOV-LAURITSEN et. al., 2009; SCOTT; DEYE; SRINIVASAN, 2007). Assim, aminoglicosídeos, quinolonas, polimixinas e tigeciclina também têm sido utilizados (MARAGAKIS; PERL, 2008; FISHBAIN; PELEG, 2010; SHIN et al., 2012). Neste contexto, os aminoglicosídeos são considerados como uma importante opção terapêutica (BASSETTI et. al., 2013), sendo usados em combinação com outras classes de antimicrobianos, principalmente os beta-lactâmicos (FISHBAIN e PELEG, 2010).

Os aminoglicosídeos são compostos policatiônicos, formados por um derivado de inositol ligado a um aminoaçúcar, contendo grupos hidroxila livres e pelo menos dois grupos amino. Nas bactérias Gram-negativas, inicialmente se ligam aos resíduos de carga negativa presentes na membrana externa, e posteriormente os grupos hidroxila e amino são os elementos chaves na interação com o RNA da subunidade 30S do ribossomo procariótico (BECKER; COOPER, 2013). O antimicrobiano se liga ao sítio A do RNA ribossômico 16S induzindo uma mudança na conformação que causa uma leitura errônea do RNA mensageiro, resultando em proteínas sem função (AZUCENA; MOBASHERY, 2001).

Esta classe de antimicrobianos consiste de vários agentes, tais como a gentamicina, amicacina, tobramicina, estreptomicina, neomicina, canamicina, entre outros. Entre estes, a amicacina, gentamicina e tobramicina são os mais prescritos, sendo a amicacina e a tobramicina os que apresentam melhor eficácia para o tratamento e infecções por *A. baumannii* (FISHBAIN; PELEG, 2010).

1.4. Resistência aos Aminoglicosídeos em *Acinetobacter baumannii*

A resistência aos antimicrobianos é um problema de saúde pública global que acarreta falha da terapia, prolongamento da internação hospitalar, aumento das taxas de mortalidade e morbidade e elevação dos custos financeiros do tratamento (PITOUT et al., 2008; SOSTARICH et al., 2008).

Os mecanismos envolvidos na resistência aos antimicrobianos podem ser intrínsecos ou adquiridos. A resistência intrínseca é a resistência natural exibida por todos os membros de uma espécie (COX; WRIGHT, 2013). Especificamente, *A. baumannii* é intrinsecamente resistente à ampicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, cefazolina, cefotaxima, ceftriaxona, ertapenem, trimetoprim e fosfomicina (http://www.eucast.org/expert_rules/ acesso em 14/05/2015). Já a resistência adquirida resulta da mutação de genes reguladores ou estruturais, e da aquisição de genes de resistência. Neste caso, o fenótipo resultante da resistência adquirida não será observado em todos os indivíduos da mesma espécie (DZIDIC; BEDEKOVIĆ, 2003; MARTINS et. al., 2012).

O uso de antimicrobianos em hospitais tem contribuído para o aumento e emergência de *A. baumannii* resistentes a um amplo número de antimicrobianos, incluindo os aminoglicosídeos (ZARRILLI et al., 2004). A resistência aos aminoglicosídeos pode ser atribuída a vários mecanismos, como modificação do alvo ribossomal, efluxo do antimicrobiano e modificação enzimática (VAKULENKO; MOBASHER, 2003).

1.4.1. Enzimas Modificadoras de Aminoglicosídeos (AMEs)

O principal mecanismo de resistência em bactérias Gram-negativas é a produção de Enzimas Modificadoras de Aminoglicosídeos (AMEs), que catalisam a modificação dos grupos –OH ou –NH₂ destes antimicrobianos (RAMIREZ; TOLMASKY, 2010; WACHINO; ARAKAWA, 2012). As AMES são classificadas em três tipos, as nucleotidiltransferases (ANTs), fosfotransferases (APHs) e acetiltransferases (AACs). Para a nomenclatura das

AMEs no presente trabalho, será adotado o código de três letras para identificar sua atividade (APH, ANT, AAC), seguido por um número entre parênteses (identifica o sítio de modificação do antimicrobiano), um número romano (indica o perfil particular de resistência) e uma letra minúscula como identificação individual, o parênteses e a subclasse são separados por um hífen, por exemplo, APH(3')-Ia (BECKER; COOPER, 2013).

Os genes que codificam estas enzimas estão localizados em elementos genéticos móveis e com alta capacidade de disseminação, como plasmídeos, transposons e integrons (DIJKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007). Estes genes encontram-se junto a outros determinantes de resistência como beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) e carbapenemases resultando em isolados multirresistentes (RAMIREZ; TOLMASKY, 2010).

As acetiltransferases (AAC) modificam os aminoglicosídeos transferindo um grupo acetil da acetil-coenzima A para um grupo amino deste antimicrobiano (CALDWELL; BERGHUIS, 2012). Essas enzimas catalisam a acetilação em quatro regiões diferentes (1, 3, 2' ou 6'), recebendo as seguintes denominações AAC(1), AAC(3)-I, AAC(2') ou AAC(6'), respectivamente (RAMIREZ; TOLMASKY, 2010).

As AAC(6') já foram encontradas em plasmídeos e cromossomos e estão disseminadas entre patógenos Gram-negativos e Gram-positivos. Entre elas, as enzimas AAC(6')-I são as mais comumente encontradas e conferem resistência à amicacina, tobramicina, netilmicina, canamicina, entre outros (NIGRO; POST; HALL, 2011). AAC(3) constitui o segundo grupo mais comum de acetiltransferases e modificam gentamicina, sisomicina e fotimicina (BECKER; COOPER, 2013). Em *A. baumannii* já foram descritas as enzimas AAC(3)-Ia, AAC(3)-IIa, AAC(6')-Ib, AAC(6')-Ih, AAC(6')-Iad, AAC(6')-Im e AAC(6')-II (KARAH, 2011).

As fosfotransferases transferem um grupo fosfato do Adenosina Trifosfato (ATP) ou Guanosina Trifosfato (GTP), na presença de Mg^{2+} , para um grupo hidroxila do aminoglicosídeo (WRIGHT; THOMPSON, 1999). A classe mais numerosa é a das fosfotransferases 3' [APH(3')] e, desta classe, a subclasse mais prevalente em Gram-negativos é das enzimas APH(3')-I (VAKULENKO; MOBASHERY, 2003). Outra subclasse destas enzimas é APH(3')-VI, codificadas pelo gene *aph(3')-VI*, descrito pela primeira vez em um isolado de *A. baumannii*, e, até os dias atuais, apresenta-se como a fosfotransferase mais frequente nesta espécie, conferindo resistência à vários antimicrobianos, como amicacina, canamicina e neomicina (BECKER; COOPER, 2013).

As nucleotíldiltransferases transferem um grupo adenilato do ATP ao grupo hidroxila do aminoglicosídeo. Compreendem cinco classes: ANT(2''), ANT(3''), ANT(4'), ANT(6),

ANT(9) (RAMIREZ; TOLMASKY, 2010). ANT(2'') confere resistência à amicacina, tobramicina e gentamicina, que são os aminoglicosídeos mais frequentemente prescritos (AVENT et al., 2011). Em *A. baumannii* já foram relatados ANT(2'')-Ia, ANT(3'')-Ia e ANT(3'')-Id (KARAH, 2011).

1.4.2. Enzimas 16S rRNA Metiltransferases

Outro mecanismo de resistência aos aminoglicosídeos que ganhou importância nos últimos anos é a produção das metiltransferases 16S rRNA, as quais tem sido relatadas entre espécies de *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp. Estas enzimas conferem elevados níveis de resistência a todos os aminoglicosídeos, pela metilação pós-transcricional sítio-específica do RNA ribossômico 16S (sítio A) (CHO et al., 2009; DOI; ARAKAWA, 2007).

Até o presente, foram descritos dez tipos de metiltransferase 16S rRNA. Uma delas, denominada ArmA (*Aminoglycoside Resistance Methyltransferase*), foi descrita por Galimand e colaboradores (2003) em *Klebsiella pneumoniae*. Outros oito tipos descritos são variantes de Rmt (*Ribosomal Methyltransferases*), como RmtA (YOKOYAMA; DOI; YAMANE, 2003), RmtB (DOI; YOKOYAMA; YAMANE, 2004), RmtC (WACHINO et al., 2006), RmtD (DOI et al., 2007), RmtE (DAVIS et al., 2010), RmtF (GALIMAND; COURVALIN; LAMBERT, 2012), RmtG (BUENO et al., 2013) e RmtH (O'HARA et al., 2013). Outro tipo de metiltransferase 16S rRNA é NpmA (WACHINO et al., 2007). Todas são codificadas por genes associados com elementos genéticos móveis, evidenciando a sua capacidade de disseminação horizontal intra e inter espécie (YAMANE et al., 2007).

O gene *armA* tem sido identificado em espécies de *Acinetobacter* spp estudadas em diversos países do leste da Ásia, Europa Ocidental e Oriental (YAMANE et al., 2007). Por outro lado, *rmtB* foi detectado em várias espécies pertencentes à família *Enterobacteriaceae* no Japão, Taiwan, Coreia do Sul, China e Bélgica (DOI; ARAKAWA, 2007) e *A. baumannii* (TADA et al., 2013). Além disso, um estudo recente realizado por nosso grupo de pesquisa, detectou o gene *rmtB* em isolados clínicos de *K. pneumoniae* altamente resistentes aos aminoglicosídeos (TOLENTINO, 2014), comprovando a ocorrência de cepas carreadoras deste gene no Brasil.

Segundo Doi e Arakawa (2007), a abordagem sugerida na identificação de organismos que produzem 16S rRNA metilases é uma triagem dos isolados de *Enterobacteriaceae*, espécies de *Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas aeruginosa*. Os isolados que apresentam

resistência a todos os aminoglicosídeos testados pela metodologia de disco-difusão devem ser submetidos a pesquisa para a identificação dos genes de resistência. Esta abordagem foi adotada no presente trabalho.

1.5. Tipagem Molecular de *A. baumannii*

A. baumannii ocorre de maneira endêmica e epidêmica em hospitais, sendo notável a ocorrência de cepas multirresistentes nestes ambientes (DIJKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007). A rápida emergência de cepas de *Acinetobacter* spp. multirresistentes e panresistentes destaca a habilidade deste organismo de adaptação a mudanças seletivas e pressões ambientais (HOWARD et al., 2012). Estudos de tipagem comparativa de cepas epidêmicas multirresistentes também indicaram que pode ocorrer disseminação entre diferentes hospitais, provavelmente devido à transferência de pacientes colonizados. Isto ocorre em uma determinada área geográfica, como já observado na República Tcheca (NEMEC et al., 1999), Reino Unido (TURTON et al., 2004), Portugal (SILVA et al., 2007) e Estados Unidos (QUALE et al., 2003).

Para controlar a disseminação de *A. baumannii* no ambiente hospitalar é fundamental a identificação de reservatórios potenciais do micro-organismo e os modos de transmissão. Além disso, a comparação de isolados é necessária na distinção das cepas relacionadas com surtos e outros acinetos não relacionados, utilizando-se métodos de tipagem epidemiológica (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008; VISCA; SEIFERT; TOWNER, 2011).

Tipagens fenotípicas, como perfis bioquímicos, testes de suscetibilidade a antimicrobianos, sorotipagem e perfis proteicos são ainda utilizados, mas estão sendo substituídos por sistemas de tipagem molecular (VISCA; SEIFERT; TOWNER, 2011). A tipagem molecular, ou genotipagem comparativa, é baseada na variação genética encontrada entre diferentes espécies e cepas, e permite a realização de estudos de filogenia e epidemiologia molecular para a identificação e monitoramento da distribuição de microrganismos. O conhecimento destas informações facilita a implementação de medidas de controle da disseminação e no caso de microrganismos resistentes a antimicrobianos pode orientar a conduta da terapia antimicrobiana de forma a aumentar sua eficiência e reduzir a prevalência de clones resistentes (PATERSON et al., 2000; RAHAL et al., 1998; RICE, 1999).

Uma ampla gama de métodos de tipagem molecular está disponível para estudos epidemiológicos (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008; VISCA; SEIFERT; TOWNER,

2011). Estas técnicas podem ser baseadas na análise de ácidos nucleicos, de proteínas e da expressão de genes. Entre elas, as técnicas de *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) e *Repetitive Extragenic Palindromic* PCR (REP-PCR) têm sido descritas como eficientes para a tipagem molecular de patógenos bacterianos (DURMAZ et. al., 2009; HIGGINS et. al., 2012; SINGH et. al., 2006).

A técnica de PFGE é considerada padrão ouro para a tipagem molecular de várias espécies bacterianas, incluindo *Acinetobacter* spp. (HIGGINS et al., 2012). Esta técnica utiliza enzimas de restrição que fragmentam o DNA genômico bacteriano. Os fragmentos gerados são separados por eletroforese em campo pulsado, utilizando equipamento especializado, e os perfis gerados são comparados visualmente ou utilizando *softwares*. Este método permite o reconhecimento de cepas epidêmicas e a detecção precoce de surtos em hospitais ou entre hospitais. No entanto, este é um método que requer vários dias de preparação, execução e padronização para análises entre laboratórios (SEIFERT et al., 2005).

Como alternativa para a técnica de PFGE, métodos baseados em PCR (*Polymerase Chain Reaction*) têm sido amplamente utilizados (SINGH et al., 2006). A REP-PCR é um método que utiliza *primers* que hibridizam com sequências repetitivas intergênicas e não-codificadoras dispersas pelo genoma. *Amplicons* de diferentes tamanhos são gerados de acordo com a posição dos elementos repetitivos ao longo do genoma, e são visualizados por eletroforese em gel de agarose. Os seus padrões de bandas comparados para determinar a relação genética entre os isolados bacterianos analisados (CARRETTO et. al. 2011). A tipagem por REP-PCR é de rápida execução e apresenta boa capacidade discriminatória (SAEED et. al., 2006). A maior limitação do método é a baixa reprodutibilidade que pode resultar da variabilidade de reagentes e sistemas de eletroforese (SABAT et. al., 2013).

Técnicas com maior capacidade discriminatória, como a associação de PCR e o PFGE, permitem distinguir entre cepas de um mesmo clone, mutações pontuais responsáveis pela resistência específica a determinadas classes de agentes antimicrobianos (TOSIN; SILBERT; SADER, 2003). Desse modo, a utilização de técnicas moleculares validadas permite melhor caracterização da epidemiologia de *A. baumannii* presentes em ambientes hospitalares, seu modo de disseminação, o papel dos indivíduos na sua transmissão e a importância da sobrevivência destes organismos em superfícies ambientais (VISCA; SEIFERT; TOWNER, 2011).

2. JUSTIFICATIVA

As infecções por *A. baumannii* multirresistentes resultam em alta mortalidade, e por isso, este patógeno têm sido, em vários países, alvo de amplos estudos visando o conhecimento de fatores clínicos e epidemiológicos associados às infecções, e também para a identificação dos determinantes genéticos da resistência aos antimicrobianos.

No Hospital de Base da Fundação Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (HB), são observadas altas taxas de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), causadas por patógenos resistentes a várias classes de antimicrobianos. Entre estes, *Acinetobacter baumannii* multirresistentes tem-se destacado pela crescente prevalência, principalmente nas unidades de terapia intensiva (UTIs), onde promovem infecções de difícil tratamento em pacientes propensos devido à imunossupressão, internação e antibioticoterapia prolongados, rompimento de barreiras físicas ou doenças de base.

A gravidade dos quadros clínicos dos pacientes atendidos no HB resulta das características da instituição, que é um importante hospital-escola de nível terciário do Estado de São Paulo, com 720 leitos distribuídos entre alas clínicas, cirúrgicas e unidades de terapia intensiva, que atende a uma população de 2 milhões de habitantes dos 102 municípios pertencentes à Divisão Regional de Saúde de São José do Rio Preto (DRS 15). Nesta instituição são realizados procedimentos de alta complexidade, como cirurgias cardíacas, neurocirurgias, atendimento ao trauma e transplantes de rim, fígado, medula óssea e córnea, entre outros. Além disso, é o único hospital de referência para o tratamento de Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) e fibrose cística na região. Em média, a Instituição realiza 2.250 cirurgias mensalmente, 12.000 atendimentos de emergência e 4.000 atendimentos no Instituto do Câncer.

Com relação às infecções por *A. baumannii* na instituição, um estudo anterior (POLOTTO, 2014) foi realizado com cem cepas resistentes aos carbapenêmicos isolados no HB em 2012. Neste estudo, foram observadas cepas resistentes aos aminoglicosídeos, e este achado chamou a atenção, pois os aminoglicosídeos são considerados como opção para o tratamento de infecção por cepas resistentes aos carbapenêmicos.

Sendo assim, o presente estudo foi conduzido para o acompanhamento da evolução das taxas de resistência aos aminoglicosídeos em *A. baumannii* no HB, e também para o conhecimento do perfil de genes de resistência e da disseminação na instituição. Foram determinados o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos e a diversidade de genes

responsáveis pela resistência aos aminoglicosídeos. A tipagem molecular foi realizada visando a comparação dos isolados deste estudo com os estudados em 2012. Estes dados poderão auxiliar na conduta terapêutica e no controle da disseminação de cepas resistentes, o que exerce impacto positivo na qualidade da assistência médica prestada e no prognóstico dos pacientes.

3. OBJETIVOS

a. Objetivo Geral

Avaliar e comparar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos, genes de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AMEs), genes de enzimas 16S rRNA metilases, e similaridade genética entre isolados de *A. baumannii*.

b. Objetivos Específicos

- Identificar entre bactérias do complexo *A. baumannii*-*A. calcoaceticus* isolados que pertençam à espécie *A. baumannii*;
- Determinar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos por teste automatizado de microdiluição nos isolados de *A. baumannii*;
- Realizar o teste de suscetibilidade aos aminoglicosídeos por disco-difusão nos isolados de *A. baumannii*;
- Verificar a ocorrência de diferenças significativas entre as metodologias de microdiluição automatizada e disco-difusão para os aminoglicosídeos Amicacina e Gentamicina;
- Investigar a presença dos genes de AMEs: acetiltransferases (*aac*), fosfotransferases (*aph*) e nucleotidiltransferases (*ant*);
- Verificar a correspondência do genótipo de AMEs com a resistência fenotípica aos aminoglicosídeos;
- Realizar a tipagem molecular de *A. baumannii*;
- Identificar o perfil de distribuição dos isolados resistentes;

- Comparar os resultados obtidos no presente estudo com dados de um estudo anterior realizado em 2012 e 2013, relacionando o perfil de suscetibilidade, frequência dos genes de AMEs e similaridade genética de *A. baumannii* resistentes entre estes dois estudos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção dos Isolados

Foram selecionados para o estudo 32 isolados do Complexo *Acinetobacter baumannii*-*A. calcoaceticus*, obtidos consecutivamente de pacientes admitidos no HB. Os isolados do Complexo *Acinetobacter baumannii*-*A. calcoaceticus* foram coletados no período entre dezembro de 2013 e maio de 2014. Foram consideradas para o estudo apenas um isolado originado de cada paciente, de diversos sítios (hemoculturas, uroculturas, culturas de aspirado traqueal, líquido pleural, líquido peritoneal, *swab* e lavado bronco-alveolar). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de ética em pesquisa da FAMERP (protocolo 20481613.7.0000.5415). Além dos isolados do presente estudo, foram considerados outros cem *A. baumannii* anteriormente estudados (POLOTTO, 2014) coletados em 2012 para a comparação dos resultados obtidos entre estes dois trabalhos.

O **Quadro 1** resume as características dos 32 isolados, como data de coleta, unidade de internação e tipos de materiais dos quais o referido patógeno foi isolado. Esses foram recuperados a partir de diversos materiais biológicos, como aspirado traqueal (17/32), ponta de cateter (4/32), *swab* (1/32), sangue (6/32), secreção traqueal (1/32), urina (2/32) e líquido (1/32).

Quadro 1 - Resumo das características dos isolados clínicos de *A. baumannii* deste estudo.

Cepa	Data	Unidade de internação	Material
Ac 151	09/12/2013	Enfermaria SUS	Aspirado traqueal
Ac 152	11/12/2013	Enfermaria SUS	Ponta de cateter
Ac 153	12/12/2013	Enfermaria SUS	Swab
Ac 154	15/12/2013	UTI Geral SUS	Aspirado traqueal
Ac 155	16/12/2013	UTI Geral SUS	Aspirado traqueal
Ac 156	20/12/2013	UTI Geral SUS	Aspirado traqueal
Ac 157	22/12/2013	UTI Geral SUS	Sangue
Ac 158	30/12/2013	UTI Geral Convênio	Ponta de cateter
Ac 159	01/01/2014	UTI Geral Convênio	Aspirado traqueal
Ac 160	02/01/2014	UTI Semi-intensiva	Aspirado traqueal
Ac 161	03/01/2014	UTI Semi-intensiva	Ponta de cateter
Ac 162	04/01/2014	UTI Geral SUS	Aspirado traqueal
Ac 163	07/01/2014	Enfermaria SUS	Aspirado traqueal
Ac 164	08/01/2014	UTI Geral SUS	Aspirado traqueal
Ac 165	10/01/2014	UTI Geral SUS	Secreção traqueal
Ac 166	16/01/2014	UTI Semi-intensiva	Aspirado traqueal
Ac 167	18/01/2014	UTI Geral SUS	Sangue
Ac 168	24/01/2014	UTI Geral Convênio	Urina
Ac 169	30/01/2014	UTI Geral SUS	Ponta de cateter
Ac 170	31/01/2014	UTI Emergência	Aspirado traqueal
Ac 171	16/02/2014	UTI Geral Convênio	Aspirado traqueal
Ac 172	23/02/2014	Enfermaria SUS	Sangue
Ac 173	24/02/2014	UTI Geral SUS	Líquor
Ac 174	08/03/2014	UTI Geral Convênio	Sangue
Ac 175	12/03/2014	UTI Geral SUS	Aspirado traqueal
Ac 176	24/03/2014	UTI Geral SUS	Aspirado traqueal
Ac 177	04/04/2014	Enfermaria SUS	Aspirado traqueal
Ac 178	06/04/2014	UTI Cardiológica Adulto	Sangue
Ac 179	28/04/2014	UTI Cardiológica Adulto	Sangue
Ac 180	29/04/2014	UTI Cardiológica Adulto	Aspirado traqueal
Ac 181	23/05/2014	UTI Semi-intensiva	Aspirado traqueal
Ac 182	24/05/2014	UTI Geral Convênio	Urina

4.2 Identificação e Determinação do Perfil de Suscetibilidade aos Antimicrobianos

A identificação dos *A. baumannii* deste estudo foi realizada por meio de duas metodologias distintas. Primeiramente, os isolados clínicos foram identificados no Laboratório Central do HB por meio de metodologia automatizada (Vitek 2®, *Biomérieux*, France), que identifica o complexo *A. baumannii*-*A. calcoaceticus*.

O inóculo dos isolados foi preparado pelo método de suspensão direta de colônias, e, para isso, 3 mL de solução salina a 0,85% foi distribuído em dois tubos de ensaio, (um tubo utilizado para o teste de identificação e o outro para o TSA). No tubo utilizado para a identificação foram inoculadas aproximadamente cinco colônias isoladas de culturas puras crescidas em ágar MacConkey, ágar sangue ou ágar chocolate (*Biomerieux*®, França), e após isso, a turbidez ideal (0,5 na escala de MacFarland - $1,5 \times 10^8$ UFC/ml) foi ajustada com auxílio do densitômetro Densichek™ (*Biomerieux*®, França).

Em seguida, 120 uL dessa suspensão foram adicionados ao tubo utilizado para o TSA. O cartão de identificação de bacilos Gram-negativos (*Biomerieux*®, França) foi adicionado ao primeiro tubo e o cartão de antibiograma (AST-N105) ao segundo tubo. Em seguida, os tubos foram inseridos no equipamento, e, após aproximadamente 7 horas de incubação, o resultado da identificação e do antibiograma foram liberados.

A segunda metodologia corresponde à identificação por meio da técnica de PCR descrita no item 4.5.

Os testes de suscetibilidade aos antimicrobianos foram realizados por meio da técnica automatizada de microdiluição (Vitek 2®, *Biomérieux*, France), de acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2014). Os antimicrobianos testados para o complexo *A. baumannii*-*A. calcoaceticus* foram: Amicacina (AK), Gentamicina (CN), Ceftazidima (CAZ), Cefepima (FEP), Ceftriaxona (CRO), Imipenem (IPM), Meropenem (MEM), Ampicilina/sulbactam (SAM), Piperacilina/tazobactam (TZP), Ciprofloxacina (CIP), Polimixina B (PB), Colistina (COL) e Tigeciclina (TIG).

A interpretação do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos foi conduzida de acordo com as recomendações estabelecidas no documento M100-S24 (CLSI, 2014), exceto para a Tigeciclina (TIG), pois não existem valores de referência de CIM neste documento para este antimicrobiano. Assim, para a interpretação da suscetibilidade à Tigeciclina foram utilizadas as recomendações do documento NDA 21-821/S-026 e S-031 do *Food and Drug Administration* (FDA, 2013).

(http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2013/021821Orig1s026.pdf acesso em 14/05/2015) como mostrado no **Quadro 2**.

Quadro 2 - Padrões de interpretação de valores de CIM para *Acinetobacter* spp., segundo CLSI, 2014 e FDA, 2013.

Agente Antimicrobiano	Conteúdo do Disco	Critério Interpretativo CIM (µg/mL)		
		S	I	R
Aminoglicosídeos				
Amicacina (AK)	30 µg	≤16	32	≥64
Gentamicina (CN)	10 µg	≤4	8	≥16
Cefalosporinas				
Ceftazidima (CAZ)	30 µg	≤8	16	≥32
Cefepima (FEP)	30 µg	≤8	16	≥32
Ceftriaxona (CRO)	30 µg	≤8	16-32	≥64
Carbapenêmicos				
Imipenem (IPM)	10 µg	≤2	4	≥8
Meropenem (MEM)	10 µg	≤2	4	≥8
β-Lactâmicos/Inibidores de β-Lactamases				
Ampicilina-Sulbactam (SAM)	10/0 µg	≤8/4	16/8	≥32/16
Piperacilina-Tazobactam (TZP)	100/10 µg	≤16/4	32/4 - 64/4	≥128/4
Fluoroquinolonas				
Ciprofloxacina (CIP)	5 µg	≤1	2	≥4
Lipopeptídeos				
Polimixina B (PB)	—	≤2	—	≥4
Colistina (COL)	—	≤2	—	≥4
Tetraciclinas				
Tigeciclina (TIG) ^a	—	≤2	4	≥8

S: Sensível; I: Intermediário; R: Resistente; ^a: Interpretação de acordo com FDA (2013).

Além do teste de suscetibilidade automatizado para os treze antimicrobianos anteriormente descritos, foi realizado o teste de disco-difusão em ágar *Müeller-Hinton* (*Oxoid* – *Hampshire*, Inglaterra), somente para os aminoglicosídeos Amicacina, Gentamicina, Tobramicina e Canamicina. Este teste foi realizado para a confirmação dos resultados obtidos para Amicacina e Gentamicina, bem como inclusão de dados de suscetibilidade à Tobramicina e Canamicina, pois estes não foram testados anteriormente por meio da metodologia automatizada. Estes resultados permitem uma melhor interpretação da correspondência genótipo-fenótipo do perfil de AMEs com a suscetibilidade aos aminoglicosídeos citados anteriormente. Desse modo, esta discussão para os aminoglicosídeos foi realizada diferencialmente dos demais antimicrobianos, com os valores de disco-difusão e microdiluição, já que é o foco do presente estudo.

O controle de turbidez para a preparação do inóculo bacteriano foi feito utilizando-se uma solução de BaSO₄, equivalente a uma solução padrão de *Mc Farland* 0,5 ou seu

equivalente óptico. O inóculo bacteriano foi incubado em caldo *Müeller-Hinton*, a 37 °C, até alcançar ou exceder a turbidez de uma solução padrão de *Mc Farland* 0,5. Nos casos de turbidez excedida, foi realizado o ajuste com caldo *Müeller-Hinton* (*Oxoid – Hampshire, Inglaterra*), obtendo-se uma turbidez óptica comparável à da solução padrão de *Mc Farland* 0,5.

Com o auxílio de um *swab* de algodão estéril, a superfície seca da placa de ágar *Müeller-Hinton* foi inoculada, esfregando o suabe em toda a superfície estéril do ágar. Utilizando uma pinça previamente flambada e resfriada, o conjunto de discos antimicrobianos foi colocado na superfície de uma placa de ágar semeada, pressionando-os de encontro à placa, de maneira a assegurar o contato completo com a superfície de ágar.

As placas foram invertidas e colocadas em estufa, a 37 °C, até 15 minutos após a aplicação dos discos. Após 18 a 20 horas de incubação, as culturas foram analisadas para verificar se o inóculo bacteriano foi satisfatoriamente semeado. O halo de inibição foi considerado a área sem crescimento a olho nu. Os diâmetros dos halos foram mensurados, incluindo o diâmetro dos discos e, de acordo com os tamanhos dos halos de inibição, os microrganismos foram classificados como sensíveis, intermediários ou resistentes aos antimicrobianos testados.

A interpretação dos testes de suscetibilidade aos aminoglicosídeos por disco-difusão também foi realizada de acordo com as recomendações do CLSI (2014). Para Canamicina foram utilizados os valores de referência para *Enterobacteriaceae*, devido à ausência destes valores para *Acinetobacter* spp neste documento. Além disso, na literatura há trabalhos que utilizam valores de referência de *Enterobacteriaceae* em *A. baumannii* para verificar a suscetibilidade à antimicrobianos que se enquadram no caso descrito acima para Canamicina, como a Tigeciclina (ADAMS-HADUCH et al., 2008; DONG et al., 2014; SADER et al., 2013). O **Quadro 3** mostra os valores de referência de diâmetro do halo (mm) para os aminoglicosídeos testados.

Quadro 3 - Padrões de interpretação de valores de diâmetro do halo de inibição (mm) para *Acinetobacter* spp., segundo CLSI, 2014.

Agente Antimicrobiano	Conteúdo do Disco	Critério Interpretativo Diâmetro do Halo (mm)		
		S	I	R
Amicacina (AK)	30 µg	≥17	15-16	≤14
Gentamicina (CN)	10 µg	≥15	13-14	≤12
Tobramicina (TOB)	10 µg	≥15	13-14	≤12
Canamicina (CAN)	30 µg	≥18	14-17	≤13

S: Sensível; I: Intermediário; R: Resistente; AK: Amicacina; CN: Gentamicina; CAN: Canamicina; TOB: Tobramicina.

Com base nos perfis de suscetibilidade encontrados, foram derivados os perfis de resistência. Estes perfis de resistência abrangem apenas os antimicrobianos aos quais os isolados clínicos de *A. baumannii* apresentaram valores de CIM ($\mu\text{g/mL}$) e diâmetro do halo (mm) para intermediários e resistentes. (CLSI, 2014).

4.3 Armazenamento e Manutenção dos Isolados

Posteriormente, os isolados clínicos foram encaminhados ao Laboratório de Microbiologia da FAMERP, onde foram inoculados em ágar *MacConkey* (Himedia, Mumbai, Índia) e mantidos em coleções de cultura em freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para isso, uma colônia isolada obtida da placa de *MacConkey* foi inoculada em caldo *Tryptic Soy Broth* (TSB, BACTO™, França) a 37°C por 16-18 horas. Após este tempo, 0,7 ml de cada cultura foi transferido para criotubos estéreis previamente rotulados, onde foram adicionados 0,3 ml de glicerol 50% estéril. Para cada isolado, o armazenamento foi realizado em duplicata e cada criotubo identificado com um número da coleção de cultura. Paralelamente, os dados relativos a cada isolado clínico foram armazenados em uma planilha, contendo informações como seu número de identificação na coleção de cultura, sempre precedido pelo número do prontuário do paciente, data, sítio de isolamento e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos.

4.4 Extração de DNA Genômico Bacteriano

A extração do DNA genômico bacteriano foi realizada como em Polotto (2014). Inicialmente, as cepas armazenadas a -20°C foram reativadas por meio de cultivo em caldo TSB por 24 horas a 37°C . Depois disso, uma alíquota da suspensão bacteriana (2,0 ml contendo aproximadamente 10^9 células/ml) foi utilizada para a extração do DNA genômico bacteriano. Para a extração de DNA das amostras, foi realizado o seguinte procedimento: uma colônia isolada, em ágar *MacConkey*, foi incubada por 24 horas a 37°C em caldo TSB (*Oxoid, Hampshire, Inglaterra*). Em seguida, dois ml desse caldo foram centrifugados a 15000 G por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi homogeneizado em 200 μl de água Milli-Q (Millipore) e submetido à nova centrifugação a 15000 G, por 10 minutos. Novamente o sobrenadante foi descartado e o *pellet* homogeneizado em 40 μl de água Milli-Q e incubado a 100°C , por 10 minutos.

Após essa fase de liberação do DNA, a mistura foi submetida a choque térmico, em gelo, por 2 minutos e centrifugada a 15000 G, por 10 segundos a 4°C . O sobrenadante,

contendo o DNA, foi acondicionado em outro tubo de polipropileno de 1,5 ml, previamente identificado, onde foram adicionados 500 µl de etanol absoluto a -20°C (*Merck Chemicals*) e deixado em gelo, por 20 minutos. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 16000 G, por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. Foram, então, adicionados, trezentos µl de etanol 70% a -20°C (*Merck Chemicals*) e, novamente, a mistura foi submetida à centrifugação a 16000 G, por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e, após todo o etanol ter evaporado, o DNA foi ressuspensionado com 100 µl de tampão TE e 2 µl de RNase a 2 µg/ml (Kit comercial Invitrogen®) e a amostra de DNA incubada por 30 minutos a 37°C em termobloco *Thermomixer comfort* (Eppendorf). O DNA foi quantificado em espectrofotômetro Biophotometer (Eppendorf) armazenado em freezer -20°C para posterior utilização.

4.5 Identificação das Espécies de *Acinetobacter baumannii* através de Duplex-PCR

A identificação da espécie *Acinetobacter baumannii* foi conduzida segundo protocolo de PCR Duplex desenvolvido por Chen e colaboradores (2007), no qual foram utilizados dois pares de *primers* (**Quadro 9**). Um par de *primers* para amplificar a região intergênica específica da espécie *A. baumannii* (região ITS) de 208 pb e outro par para amplificar uma região altamente conservada do gene *recA* de *Acinetobacter* spp. de 425 pb (adicionado à reação com função de controle interno). Como controle negativo foi utilizada a cepa ATCC de *Escherichia coli* 25922. Esta PCR foi realizada com os seguintes reagentes descritos no **Quadro 4**.

Quadro 4- Protocolo da reação de PCR para identificação de *A. baumannii*.

Componentes	Volume
Tampão para PCR (10X)	2,0 µl
MgCl ₂ (25mM)	2,0 µl
Mistura de nucleotídeos dNTP (2,5 mM)	2,0 µl
<i>Primer</i> Ab-ITS F (10 mM)	1,0 µl
<i>Primer</i> Ab-ITS R (10 mM)	1,0 µl
<i>Primer</i> recA F (10 mM)	1,0 µl
<i>Primer</i> recA R (10 mM)	1,0 µl
<i>Taq</i> -DNA polimerase (5U/ µl)	0,2 µl
Água Ultrapura	q.s.p. 20 µl
DNA (100 ng/µl)	1,0 µl

As amostras foram colocadas no termociclador modelo T100TM (BioRad Laboratórios Brasil Ltda) com a seguinte ciclagem: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida por 30 ciclos com etapas de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 8 minutos. O produto amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1% acrescida de 0,8 µl de brometo de etídio (10mg/ml). A corrida de eletroforese foi programada por 60 minutos a 6 V/cm, o marcador de peso molecular utilizado foi de 100 pb (*Thermo Scientific*). O resultado foi visualizado e fotografado pelo fotodocumentador LPix Ex (*Loccus Biothechnology*).

4.6 Investigação de Genes de Enzimas Modificadoras de Aminoglicosídeos (AMEs)

Foram realizados três ensaios de Multiplex-PCR utilizando protocolo descrito por Akers e colaboradores (2010) para pesquisar sequências específicas das enzimas modificadoras de aminoglicosídeos: AACs, ANTs e APHs em *A. baumannii*. À reação Triplex 1 foram adicionados *primers* específicos para amplificação dos genes *aac(3)-Ia*, *aac(3)-IIa* e *aac(6')-Ih*; à reação Triplex 2 foram inclusos os *primers* para a amplificação de *aph(3')-VI*, *ant(2')-Ia* e *rrn*, e, à reação Duplex, foram utilizados os *primers* para a amplificação de *aph(3')-Ia* e *aac(6')-Ib*. O *primer* *rrn*, cujo alvo é um fragmento do gene 16S do RNA ribossômico altamente conservado em espécies bacterianas foi adicionado como controle interno da reação. Foram usados isolados previamente sequenciados e descritos (POLOTTO, 2014), como controle positivo para as reações Triplex e Duplex.

Os protocolos das reações Triplex e Duplex estão descritos nos **Quadros 5 e 6**, respectivamente, e os *primers* utilizados, no **Quadro 9**.

Quadro 5 - Protocolo das reações Triplex 1 e Triplex 2 para AMEs.

Componentes Triplex 1	Componentes Triplex 2	Volume
Tampão para PCR (10X)	Tampão para PCR (10X)	2,5 µl
MgCl ₂ (25mM)	MgCl ₂ (25mM)	3,0 µl
Mistura de nucleotídeos dNTP (2,5 mM)	Mistura de nucleotídeos dNTP (2,5 mM)	2,0 µl
<i>Primer aac(3)Ia-F (10 mM)</i>	<i>Primer aph(3)VI-F (10 mM)</i>	0,3 µl
<i>Primer aac(3)Ia-R (10 mM)</i>	<i>Primer aph(3)VI-R (10 mM)</i>	0,3 µl
<i>Primer aac(3)IIa-F (10 mM)</i>	<i>Primer ant(2)Ia-F (10 mM)</i>	0,3 µl
<i>Primer aac(3)IIa-R (10 mM)</i>	<i>Primer ant(2)Ia-R (10 mM)</i>	0,3 µl
<i>Primer aac(6)Ih-F (10 mM)</i>	<i>Primer rrn-F (10 mM)</i>	0,3 µl
<i>Primer aac(6)Ih-R (10 mM)</i>	<i>Primer rrn-R (10 mM)</i>	0,3 µl
<i>Taq-DNA polimerase (5U/ µl)</i>	<i>Taq-DNA polimerase (5U/ µl)</i>	0,2 µl
Água Ultrapura	Água Ultrapura	q.s.p. 25 µl
DNA (100 ng/µl)	DNA (100 ng/µl)	1,0 µl

A ciclagem utilizada foi a mesma para os três ensaios: desnaturação inicial à 95°C por 5 minutos, em seguida, o material foi submetido a 30 ciclos de amplificação, sendo cada ciclo composto por desnaturação à 95°C por 30 segundos, anelamento à 49°C por 1 minuto (reações Triplex 1 e 2) e à 54°C (reação Duplex) e extensão à 72°C por 1 minuto. Uma extensão final por 5 minutos a 72°C completou a reação. Os produtos amplificados foram visualizados de acordo com o item 4.5.

Quadro 6 - Protocolo da reação Duplex para AMEs.

Componentes Duplex	Volume
Tampão para PCR (10X)	2,5 µl
MgCl ₂ (25mM)	3,0 µl
Mistura de nucleotídeos dNTP (2,5 mM)	2,0 µl
<i>Primer aph(3)Ia-F (10 mM)</i>	0,3 µl
<i>Primer aph(3)Ia-R (10 mM)</i>	0,3 µl
<i>Primer aac(6)Ib-F (10 mM)</i>	0,3 µl
<i>Primer aac(6)Ib-R (10 mM)</i>	0,3 µl
<i>Taq-DNA polimerase (5U/ µl)</i>	0,2 µl
Água Ultrapura	q.s.p. 25 µl
DNA (100 ng/µl)	1,0 µl

4.7. Investigação de Genes de Enzimas 16S rRNA Metiltransferases

A investigação da presença de genes de 16S rRNA metiltransferases foi realizada para os genes *armA*, *rmtB* e *rmtC*, segundo protocolo descrito em Doi e Arakawa (2007). Um ensaio de PCR multiplex foi realizado (**Quadro 7**) e os primers utilizados estão descritos no **Quadro 9**. Como controle positivo foi utilizado um isolado de *Klebsiella pneumoniae* de estudo anterior (TOLENTINO, 2014), no qual havia sido identificado previamente o gene *rmtB*.

Para este ensaio, os isolados que apresentarem resistência a todos os aminoglicosídeos testados pela metodologia de disco-difusão foram selecionados para a realização de técnicas moleculares na busca destes genes de resistência, segundo sugerido na literatura (DOI; ARAKAWA, 2007).

A ciclagem foi iniciada com desnaturação inicial a 96°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 96°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. A eletroforese foi realizada em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo e a corrida foi programada a 100 V durante 30 minutos, a visualização foi realizada como descrito no item 4.5.

Quadro 7- Protocolo da reação multiplex para *armA*, *rmtB* e *rmtC*.

Componentes Multiplex	Volume
Tampão para PCR (10X)	2,5 µl
MgCl ₂ (25mM)	2,0 µl
Mistura de nucleotídeos dNTP (2,5 mM)	2,0 µl
<i>Primer armA F</i> (10 mM)	1,0 µl
<i>Primer armA R</i> (10 mM)	1,0 µl
<i>Primer rmtB F</i> (10 mM)	1,0 µl
<i>Primer rmtB R</i> (10 mM)	1,0 µl
<i>Primer rmtC F</i> (10 mM)	1,0 µl
<i>Primer rmtC R</i> (10 mM)	1,0 µl
<i>Taq</i> -DNA polimerase (5U/ µl)	0,2 µl
Água Ultrapura	q.s.p. 25 µl
DNA (100 ng/µl)	2,0 µl

4.8 Tipagem Molecular dos Isolados de *A. baumannii* por REP-PCR

Os *primers* utilizados (REP1 e REP2) estão descritos no **Quadro 9** e o protocolo da reação foi realizado seguindo a metodologia de Bou e colaboradores (2000), como resumido no **Quadro 8**.

Quadro 8 - Protocolo da tipagem molecular por REP-PCR.

Componentes REP-PCR	Volume
Tampão para PCR (10X)	2,5 µl
MgCl ₂ (25mM)	3,0 µl
Mistura de nucleotídeos dNTP (2,5 mM)	2,0 µl
<i>Primer</i> REP1 (10 mM)	1,25 µl
<i>Primer</i> REP2 (10 mM)	1,25 µl
<i>Taq</i> -DNA polimerase (5U/ µl)	0,4 µl
Água Ultrapura	q.s.p. 25 µl
DNA (100 ng/µl)	2,0 µl

A ciclagem foi iniciada com desnaturação inicial a 94°C por 10 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 45°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 4 minutos, e uma extensão final a 72°C por 16 minutos. A eletroforese foi realizada em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo e a corrida foi programada a 100 V durante 120 minutos, a visualização foi realizada como descrito no item 4.5.

Os padrões de identidade genética gerados por REP-PCR foram analisados com auxílio do programa BioNumerics versão 6.1 (Applied Maths, Saint-Martens-Latem, Bélgica). A similaridade genética entre os isolados foi determinada pelo índice de similaridade de Dice, e o dendrograma, construído segundo o método *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA), utilizando tolerância de posição de bandas de 1,5% e otimização de 0,5%, os isolados que apresentaram coeficiente de similaridade genética superior a 90% foram considerados do mesmo cluster (BORGES; DALLA VECHIA; CORÇÃO, 2003).

4.9 Cálculo do Teste Exato de Fisher

O cálculo do teste exato de Fisher foi realizado para investigar dois tópicos do presente trabalho: correspondência do genótipo de AMEs com a resistência fenotípica aos

aminoglicosídeos (Amicacina, Gentamicina, Tobramicina e Canamicina) e para verificar a ocorrência de diferenças significativas entre as metodologias de microdiluição automatizada e disco-difusão para os aminoglicosídeos Amicacina e Gentamicina.

O teste exato de Fisher testa diferenças entre dois grupos independentes, em relação a uma variável na qual se registra a frequência de casos entre duas alternativas (presença e ausência), levando à construção de uma tabela de contingência 2x2. O teste é semelhante a um χ^2 (qui-quadrado), porém o teste de Fisher é particularmente adequado para pequenas amostras ($n=20$ ou $20 \leq n \leq 40$), casos em que o teste do χ^2 estaria contra-indicado (CAMPOS, 2001; MOTTA; WAGNER, 2003).

Este teste foi realizado utilizando-se o programa de estatística R versão 3.0.2 (2013-09-25) - *Frisbee Sailing* em plataforma i686-pc-linux-gnu (32-bit). O valor de p considerado significativo foi $\leq 0,05$. As variáveis utilizadas para montar a tabela de contingência 2x2 foram: presença do gene de AME, ausência do gene de AME, não-suscetibilidade (resistentes e intermediários) e suscetibilidade fenotípica ao aminoglicosídeo alvo da enzima. Para a tabela de contingência 2x2 de comparação entre as metodologias dos testes de suscetibilidade, foram contabilizados os isolados que apresentaram fenótipo de suscetibilidade e não-suscetibilidade em ambos os métodos para Amicacina e Gentamicina.

Quadro 9- Primers utilizados nas reações de PCR para a identificação de *A. baumannii*, investigação de genes de AMEs, 16S rRNA Metiltransferases e tipagem molecular por REP-PCR.

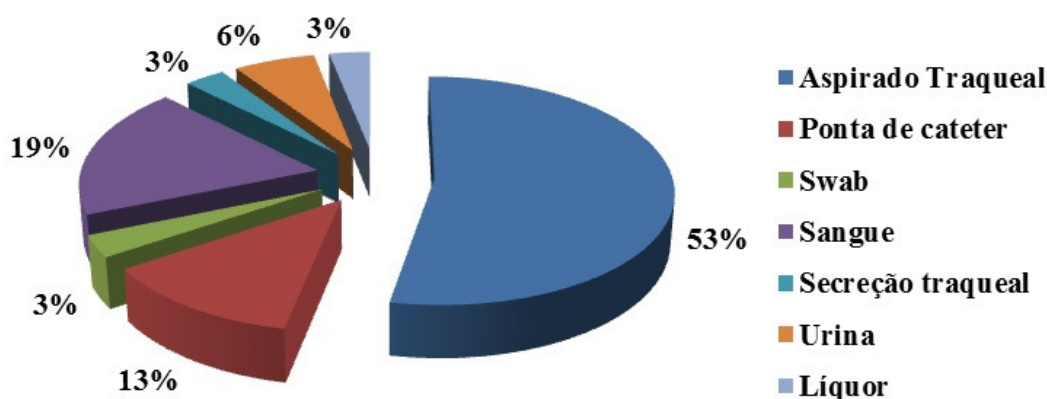
Alvo de Amplificação	Primers	Sequência 5'→ 3'	Temperatura de Anelamento	Amplicon (pb)	Referência
Identificação de <i>A. baumannii</i>					
Gene <i>recA</i> gênero <i>Acinetobacter</i> spp.	recA-F recA-R	CCTGAATCTTCTGGTAAAAC GTTTCTGGGCTGCCAAACATTAC	55°C	425	Chen et al., 2007
Gene 16S-23S rRNA <i>A. baumannii</i>	ITSAb-F ITSAb-R	CATTATCACGGTAATTAGTG AGAGCACTGTGCACTTAAG		208	
Genes de AMEs					
Gene <i>aac(6')-Ih</i> (Triplex 1)	aac(6)Ih-F aac(6)Ih-R	TGCCGATATCTGAATC ACACCACACGTTTCAG	49°C	407	Akers et al., 2010
Gene <i>aac(3)-Ia</i> (Triplex 1)	aac(3)Ia-F aac(3)Ia-R	GACATAAGCCTGTTCCGGTT CCCGCTTTCTCGTAGCA		372	
Gene <i>aac(3)-IIa</i> (Triplex 1)	aac(3)IIa-F aac(3)IIa-R	ATGCATACGCGGAAGGC TGCTGGCACGATCGGAG		822	
Gene <i>aph(3')-VI</i> (Triplex 2)	aph(3)VI-F aph(3)VI-R	CGGAAACAGCGTTTTAGA TTCCTTTTGTCAGGTC	49°C	716	
Gene <i>ant(2')-Ia</i> (Triplex 2)	ant(2)Ia-F ant(2)Ia-R	ATCTGCCGCTCTGGAT CGAGCCTGTAGGACT		404	
Gene <i>rrn</i> (16S rRNA) (Triplex 2)	rrn-F rrn-R	GAGGAAGGTGGGGATGACGT AGGCCCGGGAACGTATTAC		216	
Gene <i>aac(6')-Ib</i> (Duplex)	aac(6)Ib-F aac(6)Ib-R	TATGAGTGGCTAAATCGAT CCCGCTTTCTCGTAGCA	54°C	395	
Gene <i>aph(3')-Ia</i> (Duplex)	aph(3)Ia-F aph(3)Ia-R	CGAGCATCAAATGAAACTGC GCGTTGCCAATGATGTTACAG		623	
Genes de 16S rRNA Metiltransferases					
Gene <i>armA</i>	armA-F armA-R	ATTCTGCCTATCCTAATTGG ACCTATACTTTATCGTCGTC	55°C	315	Doi e Arakawa, 2007
Gene <i>rmtB</i>	rmtB-F rmtB-R	GCTTTCTGCGGGCGATGTAA ATGCAATGCCGCGCTCGTAT		173	
Gene <i>rmtC</i>	rmtC-F rmtC-R	CGAAGAAGTAACAGCCAAAG ATCCCAACATCTCTCCCACT		711	
Tipagem molecular por REP-PCR					
Sequências extragênicas repetitivas	REP1 REP2	IIIGCGCCGICATCAGGC ACGTCTTATCAGGCCTAC	45°C	-	Bou et al., 2000

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Perfil Clínico-Epidemiológico dos Isolados de *A. baumannii*

As **Figuras 1 e 2** ilustram a porcentagem de distribuição das 32 amostras clínicas de *A. baumannii* por material biológico e a distribuição numérica dos isolados por unidade de internação, respectivamente. Estas figuras foram derivadas da Tabela 1 do item 4.1.

Figura 1 - Distribuição dos percentuais de isolados clínicos de *A. baumannii* por material biológico.



Neste estudo, *A. baumannii* foi isolado com maior frequência de amostras de aspirado traqueal, correspondendo a 53% do total. Em seguida, destacam-se as amostras de sangue (19%) e ponta de cateter (13%) (**Figura 1**). Já as amostras clínicas menos frequentes foram urina (6%), swab, secreção traqueal e líquido, correspondendo a 3% do total cada. Desse modo, o trato respiratório dos pacientes internados nas UTIs e enfermaria do HB foi o sítio mais frequente de isolamento de *A. baumannii*, pois os isolados de aspirado traqueal em conjunto com secreção traqueal correspondem a 56% do total. A maior porcentagem de isolados originados de aspirado traqueal e sangue era esperada, pois as manifestações clínicas mais frequentes relacionadas às infecções nosocomiais por *A. baumannii* são as pneumonias associadas à ventilação mecânica (PAV) e infecções de corrente sanguínea, ambas associadas com elevados índices de morbidade e mortalidade, que podem alcançar 52% dos casos (DIJKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007).

Nas últimas décadas, *A. baumannii* emergiu como um patógeno frequentemente relacionado em infecções do trato respiratório inferior em pacientes críticos (CHAARI et al., 2013). Nas UTIs, as PAV acometem até 20% dos pacientes que recebem ventilação mecânica (RODRIGUES et. al., 2009). Em um estudo de vigilância realizado nos Estados Unidos, cerca

de 10% dos casos de pneumonia adquiridas nas UTIs foram causadas por *A. baumannii* (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008). Autores relatam a espécie *A. baumannii* como principal agente etiológico de PAV em países como Índia (MATHAI et al., 2012) e Espanha (LÓPEZ-CORTÉS; RODRIGUEZ BAÑO, 2014). Estudos realizados no Brasil também relatam *A. baumannii* como o principal agente etiológico de PAV nas UTIs (CASERTA et.al., 2012; RODRIGUES et.al., 2009; RESENDE et. al., 2013).

Em um estudo de Ferreira e colaboradores (2011), realizado em cinco hospitais no Brasil, a amostra clínica de onde *A. baumannii* foi isolado com maior frequência também foi o aspirado traqueal, totalizando 26% dos isolados. Em outro estudo brasileiro, na cidade de São Paulo, foram incluídos 515 isolados, sendo secreção traqueal a fonte de isolamento mais comum de *A. baumannii* de amostras clínicas (39,2% dos casos) (TAKAGI, 2011).

Com relação às infecções de corrente sanguínea, *A. baumannii* encontra-se na décima posição entre os organismos mais frequentemente causadores de infecções nosocomiais de corrente sanguínea nos Estados Unidos, sendo associado a 1,3% de todos os casos de infecções de corrente sanguínea causadas por um único patógeno (HOWARD et al., 2012; VISCA; SEIFERT; TOWNER, 2011). Além disso, evidências na literatura sustentam que a colonização de *A. baumannii* em cateteres é fator predisponente para o surgimento de infecções de corrente sanguínea, e 17 a 26% dos pacientes colonizados com *A. baumannii* desenvolvem este tipo de infecção (ARVANITI et. al., 2012; THOM et. al., 2011). Neste estudo, a ponta de cateter foi o terceiro espécime clínico de isolamento de *Acinetobacter baumannii* mais frequente, correspondendo a 13% (4/32) das amostras. No entanto, não houve correlação entre colonização de ponta de cateter e infecção de corrente sanguínea por este patógeno nos pacientes do presente estudo.

Outros isolados clínicos deste estudo foram provenientes de urina (6%), líquido (3%) e swab (3%). Segundo dados da literatura, estima-se que 35% dos casos de infecção urinária relatados no mundo sejam de origem nosocomial e, dentre estas, *A. baumannii* corresponde a um patógeno Gram-negativo notável em UTIs. Frequências variadas de isolamento de *A. baumannii* já foram relatadas em amostras de urina em outros trabalhos, como 9% em um estudo brasileiro de Porto Alegre (FERREIRA et al., 2011) e 19% em Israel (ABBO et al., 2005).

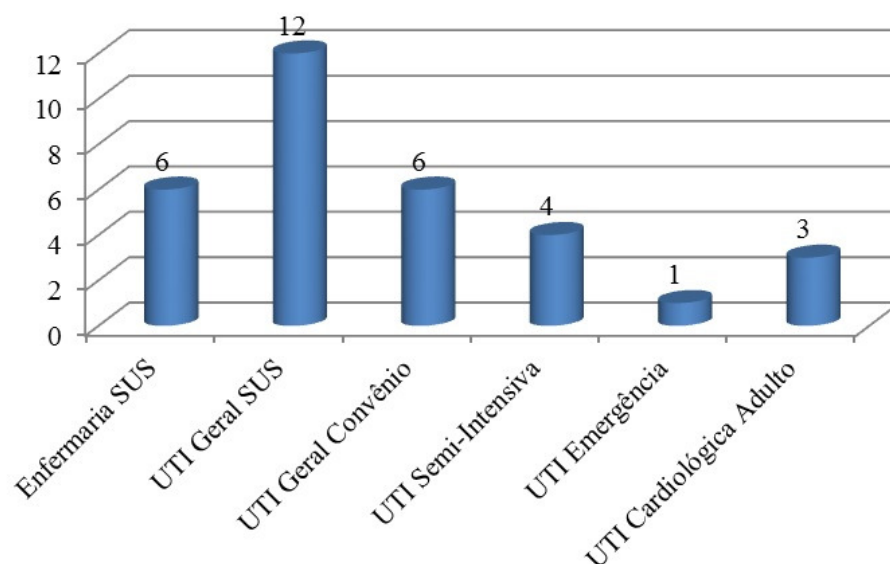
O único isolado de amostra de líquido deste estudo foi proveniente da UTI Geral do SUS, evidenciando um possível trauma ou cirurgia antecedente à infecção. Segundo Dijkshoorn e colaboradores (2007), pacientes que foram submetidos à neurocirurgia podem apresentar meningites causadas por *A. baumannii*, relacionada ao uso de drenos de líquido

cérebro-espinhal. Outros estudos também evidenciam que meningites causadas por *A. baumannii* são um motivo de preocupação (KHAN; ABUKHATTAB; BAAGER, 2012; KOURBETI et al., 2012) e necessitam estudos para aprimorar sua prevenção e tratamento (HE et al., 2013).

O único isolado de *swab* do presente estudo foi proveniente da Enfermaria do SUS. Este reduzido número de isolamento de *A. baumannii* por meio de *swab* pode ser atribuído à baixa densidade de colonização de espécies de *Acinetobacter* spp., incluindo *A. baumannii*, em superfícies corporais (DOI et al., 2011). Além disso, um estudo de Marchaim e colaboradores (2007) examinou a eficácia de culturas de *swab* no isolamento de *A. baumannii* multirresistentes, concluindo que esta metodologia de coleta não é eficaz para detectar colonização por *A. baumannii* multirresistentes.

Os 32 isolados de *A. baumannii* deste estudo foram coletados de pacientes internados em seis diferentes unidades de internação do HB, dentre estas uma enfermaria (Enfermaria SUS) e cinco UTIs (Geral SUS, Geral Convênio, Semi-intensiva, Emergência e Cardiológica Adulto) (**Figura 2**).

Figura 2 - Distribuição dos 32 isolados do estudo nas diferentes Unidades de Internação do HB.



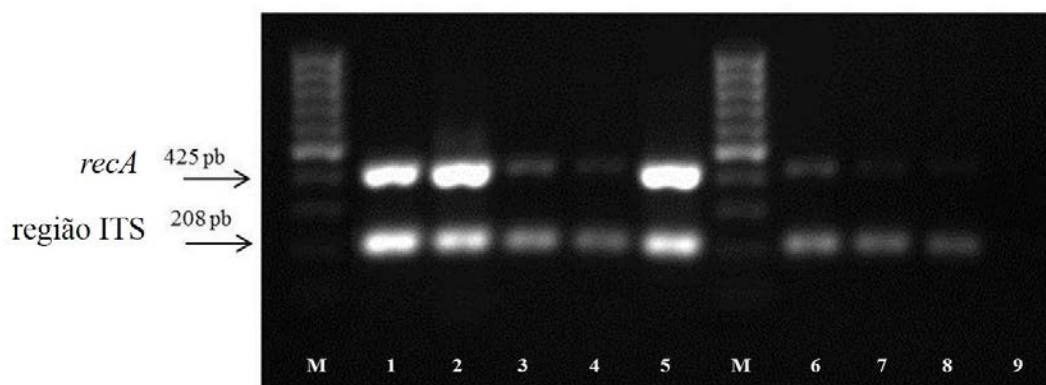
De acordo com a **Figura 2**, observa-se que a maioria dos isolados de *A. baumannii* (37,5%) foi obtida de pacientes admitidos na UTI Geral do SUS. Os locais com a segunda maior frequência de isolamento foram a Enfermaria do SUS e UTI Geral do Convênio, ambas com 18,75%. Em seguida, estão a UTI Semi-Intensiva e UTI Cardiológica Adulto, com 12,5% e 9,4%, respectivamente. Finalmente, a unidade de internação com a menor frequência

de isolamento é a UTI da Emergência, correspondendo a 3,1% dos isolados do presente estudo.

5.2 Identificação de *Acinetobacter baumannii*

Os isolados do complexo *A. baumannii* - *A. calcoaceticus* identificados anteriormente pelo sistema automatizado Vitek 2® (*Biomérieux*, France) foram submetidos a duplex-PCR, como descrito no item 4.5. Todos os 32 isolados do estudo apresentaram os dois fragmentos de 208 e 425 pares de bases (**Figura 3**) e foram confirmados como pertencentes à espécie *Acinetobacter baumannii*.

Figura 3 - Imagem do gel de agarose a 1%, resultante de eletroforese mostrando o produto de amplificação dos genes da região ITS específica da espécie *A. baumannii* (208 pb) e da região do gene *recA* presente em todo o gênero *Acinetobacter* spp. (425 pb). M: marcador de peso molecular 100 pb; amostras: Ac 151 (1), Ac 152 (2), Ac 153 (3), Ac 154 (4), Ac 155 (5), Ac 156 (6), Ac 157 (7), Ac 158 (8) e Controle Negativo (cepa ATCC *Escherichia coli* 25922) (9).



5.3 Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos

5.3.1 Perfil Geral de Suscetibilidade

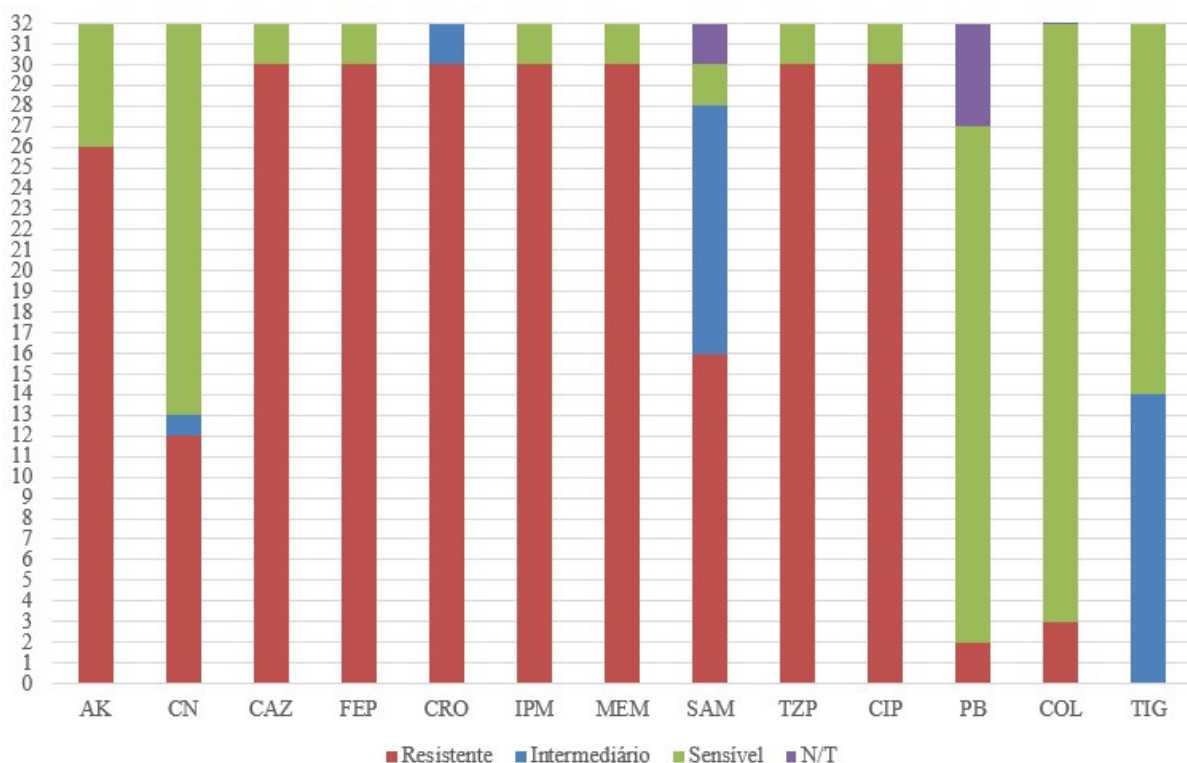
A **Tabela 1** exibe os resultados do teste de suscetibilidade por microdiluição automatizado. Treze antimicrobianos foram testados frente aos isolados de *A. baumannii*. A **Figura 4** mostra o perfil qualitativo geral de suscetibilidade aos antimicrobianos, baseado na **Tabela 1**.

Tabela 1- Perfil quantitativo de suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *A. baumannii* do estudo.

Isolado	Teste de Suscetibilidade por Microdiluição (µg/mL)												
	AK	CN	CAZ	FEP	CRO	IPM	MEM	SAM	TZP	CIP	PB	COL	TIG
	S≤16 R≥64	S≤4 R≥16	S≤8 R≥32	S≤8 R≥32	S≤8 R≥64	S≤2 R≥8	S≤2 R≥8	S≤8/4 R≥32/16	S≤16/4 R≥128/4	S≤1 R≥4	S≤2 R≥4	S≤2 R≥4	S≤2 R≥8
Ac 151	R	R (≥16)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥16)	R (≥16)	R (≥32)	R (≥128)	R (≥4)	S (0,5)	S (≤0,5)	I (4)
Ac 152	R	R (≥16)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥16)	R (≥16)	R (≥32)	R (≥128)	R (≥4)	S (0,5)	S (≤0,5)	I (4)
Ac 153	R	R (≥16)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥16)	R (≥16)	R (≥32)	R (≥128)	R (≥4)	S (0,5)	S (≤0,5)	I (4)
Ac 154	S	S (≤1)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥16)	R (≥16)	I (16)	R (≥128)	R (≥4)	S (0,25)	S (≤0,5)	S (1)
Ac 155	R	S (≤2)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥16)	R (≥16)	R (≥32)	R (≥128)	R (≥4)	S (0,5)	S (≤0,5)	S (≤0,5)
Ac 156	S	S (≤1)	S (8)	S (4)	I (16)	S (≤0,25)	S (≤0,25)	S (≤2)	S (8)	S (≤0,25)	S (0,38)	S (≤0,5)	S (≤0,5)
Ac 157	R	R (≥16)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥16)	R (≥16)	R (≥32)	R (≥128)	R (≥4)	S (0,5)	S (≤0,5)	I (4)
Ac 158	R	S	R (≥64)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥16)	R (≥16)	I (16)	R (≥128)	R (≥4)	S (0,5)	S (≤0,5)	S (1)
Ac 159	R	S	R (≥64)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥16)	R (≥16)	R (≥32)	R (≥128)	R (≥4)	S (0,75)	S (≤0,5)	S (5)
Ac 160	S	S	R (≥64)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥16)	R (≥16)	I (16)	R (≥128)	R (≥4)	S (0,38)	S (≤0,5)	S (2)
Ac 161	S	S (≤1)	S (4)	S (2)	I (16)	S (≤0,25)	S (≤0,25)	S (≤2)	S (≤4)	S (≤0,25)	S (0,38)	S (≤0,5)	S (≤0,5)
Ac 162	S	S	R (≥64)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥16)	R (≥16)	R (≥32)	R (≥128)	R (≥4)	S (0,5)	S (≤0,5)	S (≤0,5)
Ac 163	R	I	R (≥64)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥16)	R (≥16)	N/T	R (≥128)	R (≥4)	S (0,38)	N/T	I (4)
Ac 164	R	S (2)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥16)	R (≥16)	I (16)	R (≥128)	R (≥4)	S (0,5)	S (≤0,5)	S (2)
Ac 165	R	R (≥16)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥16)	R (≥16)	R (≥32)	R (≥128)	R (≥4)	N/T	S (≤0,5)	S (2)
Ac 166	R	S (2)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥16)	R (≥16)	R (≥32)	R (≥128)	R (≥4)	S (0,5)	S (≤0,5)	S (2)
Ac 167	R	S (4)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥16)	R (≥16)	R (≥32)	R (≥128)	R (≥4)	S (0,75)	S (≤0,5)	S (2)
Ac 168	R	R (≥16)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥16)	R (≥16)	R (≥32)	R (≥128)	R (≥4)	S (0,5)	S (≤0,5)	I (4)
Ac 169	R	S (≤1)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥16)	R (≥16)	R (≥32)	R (≥128)	R (≥4)	S (0,5)	S (≤0,5)	S (0,5)
Ac 170	R	R (≥16)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥16)	R (≥16)	I (16)	R (≥128)	R (≥4)	S (0,38)	S (≤0,5)	I (4)
Ac 171	R	S (2)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥16)	R (≥16)	R (≥32)	R (≥128)	R (≥4)	S (0,5)	S (≤0,5)	S (2)
Ac 172	R	S (2)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥16)	R (≥16)	R (≥32)	R (≥128)	R (≥4)	S (0,38)	S (≤0,5)	I (4)
Ac 173	R	S (4)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥16)	R (≥16)	R (≥32)	R (≥128)	R (≥4)	S (0,5)	S (≤0,5)	S (2)
Ac 174	R	R (≥16)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥16)	R (≥16)	R (≥32)	R (≥128)	R (≥4)	S (0,38)	S (≤0,5)	I (4)
Ac 175	R	S (≤1)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥16)	R (≥16)	I (16)	R (≥128)	R (≥4)	N/T	S (≤0,5)	S (1)
Ac 176	R	R (≥16)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥16)	R (≥16)	I (16)	R (≥128)	R (≥4)	N/T	S (≤0,5)	I (4)
Ac 177	S	R (≥16)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥16)	R (≥16)	I (16)	R (≥128)	R (≥4)	R (12)	R (8)	I (4)
Ac 178	R	S	R (≥64)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥16)	R (≥16)	I (16)	R (≥128)	R (≥4)	R (14)	R (≥16)	S (1)
Ac 179	R	R (≥16)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥16)	R (≥16)	I (16)	R (≥128)	R (≥4)	N/T	S (≤0,5)	I (4)
Ac 180	R	S	R (≥64)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥16)	R (≥16)	I (16)	R (≥128)	R (≥4)	N/T	R (≥16)	I (4)
Ac 181	R	R (≥16)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥16)	R (≥16)	I (16)	R (≥128)	R (≥4)	S (0,25)	S (≤0,5)	I (4)
Ac 182	R	S	R (≥64)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥16)	R (≥16)	N/T	R (≥128)	R (≥4)	S (0,5)	S (0,19)	S (0,75)

AK: Amicacina; CN: Gentamicina; CAZ: Ceftazidima; FEP: Cefepime; CRO: Ceftriaxona; IPM: Imipenem; MEM: Meropenem; SAM: Ampicilina/Sulbactam; TZP: Piperacilina/Tazobactam; CIP: Ciprofloxacina; PB: Polimixina B; COL: Colistina; TIG: Tigeciclina. I: resistência intermediária ao antimicrobiano testado; R: resistência ao antimicrobiano testado; S: sensibilidade ao antimicrobiano testado. N/T: antimicrobiano não testado.

Figura 4 - Perfil qualitativo geral de suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *A. baumannii* do estudo.



AK: Amicacina; CN: Gentamicina; CAZ: Ceftazidima; FEP: Cefepime; CRO: Ceftriaxona; IPM: Imipenem; MEM: Meropenem; SAM: Ampicilina/Sulbactam; TZP: Piperacilina/Tazobactam; CIP: Ciprofloxacina; PB: Polimixina B; COL: Colistina; TIG: Tigeciclina; N/T: antimicrobiano não testado.

Considerando-se os valores de CIM ($\mu\text{g/mL}$) que determinam resistência e resistência intermediária (não-sensíveis), nenhum isolado do estudo foi sensível à CRO. Com relação à CAZ, FEP, IPM, MEM, TZP e CIP, observou-se que 93,75% (30/32) dos isolados são resistentes. Seguindo a ordem decrescente de porcentagem de não-sensíveis, destaca-se a SAM com 93,3% (28/30), AK com 81,25% (26/32) seguido por TIG com 43,75% (14/32) e CN com 40,6% (13/32). Os antibióticos aos quais os *A. baumannii* apresentaram as maiores taxas de sensibilidade foram PB e COL, com 92,6% (25/27) e 90,6% (29/32), respectivamente.

No período em que os *A. baumannii* incluídos neste estudo foram isolados, observou-se altas taxas de resistência aos carbapenêmicos. Este perfil também é encontrado em outras instituições. Um estudo na Grécia, com duração de dez anos, demonstrou um aumento da frequência de resistência aos carbapenêmicos Imipenem e Meropenem que, no período de 2000 a 2004, foi de 43,5%, aumentando para 64,6% no período de 2005 a 2009 (GOGOU et al., 2011).

Com relação aos aminoglicosídeos Amicacina e Gentamicina, estudos também apontam uma elevada frequência de resistência, também observada no presente estudo. Viana

e colaboradores (2011) encontraram na região sul do Brasil, taxas de resistência que variaram de 79% a 82% para Amicacina e de 75% a 81% para a Gentamicina, em um período de dez anos. Em nosso estudo, taxas semelhantes foram encontradas para Amicacina (81,25%), enquanto as taxas para Gentamicina foram menores (40,6%).

A frequência de resistência à Ceftazidima e ao Cefepime foi de 93,7%. Com relação à Ceftriaxona, nenhum isolado de *A. baumannii* deste estudo apresentou sensibilidade. Resultados semelhantes foram encontrados em um estudo do Irã, que relatou 94,4% de isolados resistentes à Ceftazidima e ao Cefepime (HOJABRI et al., 2014). Em outro estudo, realizado na Índia, a taxa de resistência à Ceftazidima também foi elevada (96,3%) entre *A. baumannii* isolados em UTIs (MATHAI et al., 2012).

Também encontramos dados concordantes com outros no caso dos antimicrobianos Ampicilina/Sulbactam e Piperacilina/Tazobactam. Em um estudo multicêntrico na Alemanha, realizado entre 2002 e 2006, com *A. baumannii* multirresistentes, os autores relataram, aproximadamente, 40% de resistência à Ampicilina/Sulbactam e 85% à combinação de Piperacilina/Tazobactam (WADL et al., 2010). Dent e colaboradores (2010) descreveram 58% de resistência à Ampicilina/Sulbactam e De Francesco e colaboradores (2013), 80% para Piperacilina/Tazobactam. Estes dados são concordantes com o presente estudo no fato de terem encontrado taxas maiores de resistência à Piperacilina/Tazobactam, em comparação com Ampicilina/Sulbactam (**Figura 4**).

Com relação à Ciprofloxacina, observou-se resistência em 93,7% dos isolados. Elevadas taxas de resistência foram descritas em outros estudos, sendo 98% na China (LIM; SHIN; KIM, 2007), 97,8% na Tunísia (CHAARI et al., 2013), 86% na Colômbia (REGUERO et al., 2013) e 100% no Brasil (CARVALHO et al., 2009). Apesar das quinolonas terem sido consideradas drogas promissoras para o tratamento de infecções causadas por *A. baumannii*, esses compostos deixaram de ser eficazes contra este patógeno na região da América Latina (URBAN et. al., 2003).

Em relação à Tigeciclina, foram registrados 43,75% de isolados não-suscetíveis. Esta droga corresponde a uma nova gliciciclina, desenvolvida em resposta a emergência de resistência a outros antimicrobianos, e exibe um amplo espectro de ação antibacteriana. Sua estrutura e ação são análogas às Tetraciclina (YAHAV et al., 2011). Apesar de ser uma droga recente, já há relatos na literatura do crescente número de *A. baumannii* resistentes. Um estudo grego relatou um aumento de 0% para 42,9% de resistência em isolados de corrente sanguínea entre os anos de 2006 e 2013 (SPILIOPOULOU et al., 2014).

Os antimicrobianos mais ativos contra os *A. baumannii*, no atual estudo, foram Colistina (ou Polimixina E) e Polimixina B, com taxas de 90,6% e 92,6% de sensibilidade, respectivamente. Resultados semelhantes foram relatados em estudos de vigilância realizados na América Latina, Ásia, Europa e América do Norte (GALES; JONES; SADER, 2006; TOGNIM et. al., 2004). Em um estudo na Polônia, já foram relatados isolados com 90% de suscetibilidade à Colistina ou Polimixina E (SIENIAWSKI et al., 2013). Apesar de estes antimicrobianos serem os mais ativos contra *A. baumannii*, seu crescente uso, devido ao rápido desenvolvimento de resistência aos carbapenêmicos, enfatiza a importância do teste de suscetibilidade para estes antimicrobianos (SPILIOPOULOU et al., 2014).

Um estudo de vigilância realizado no Brasil entre de 2007 a 2010, em 16 hospitais envolvendo 2563 pacientes com infecção de corrente sanguínea, mostrou que entre *Acinetobacter* spp., mais de 50% apresentaram resistência às cefalosporinas, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e carbapenêmicos. Para os carbapenêmicos, observaram-se taxas de 55,9% para Imipenem e 56,4% para Meropenem. Além disso, foram registradas taxas de 70% para Ceftazidima, 77,7% para Cefepime, 51,8% para Gentamicina, 73,4 para Ciprofloxacina e 75,7% para Piperacilina/Tazobactam (MARRA et. al., 2011). Comparando-se o estudo citado (MARRA et. al., 2011) com o presente trabalho, diferenças notáveis são observadas. Os isolados do HB do atual estudo apresentaram maiores taxas de resistência (93,75%) para os antimicrobianos Imipenem, Meropenem, Ceftazidima, Cefepime, Ciprofloxacina e Piperacilina/Tazobactam. Para o aminoglicosídeo Gentamicina, a frequência de isolados não-suscetíveis foi de 40,6%, porcentagem menor do que o estudo de vigilância nacional.

5.3.2 Perfil de Suscetibilidade aos Aminoglicosídeos

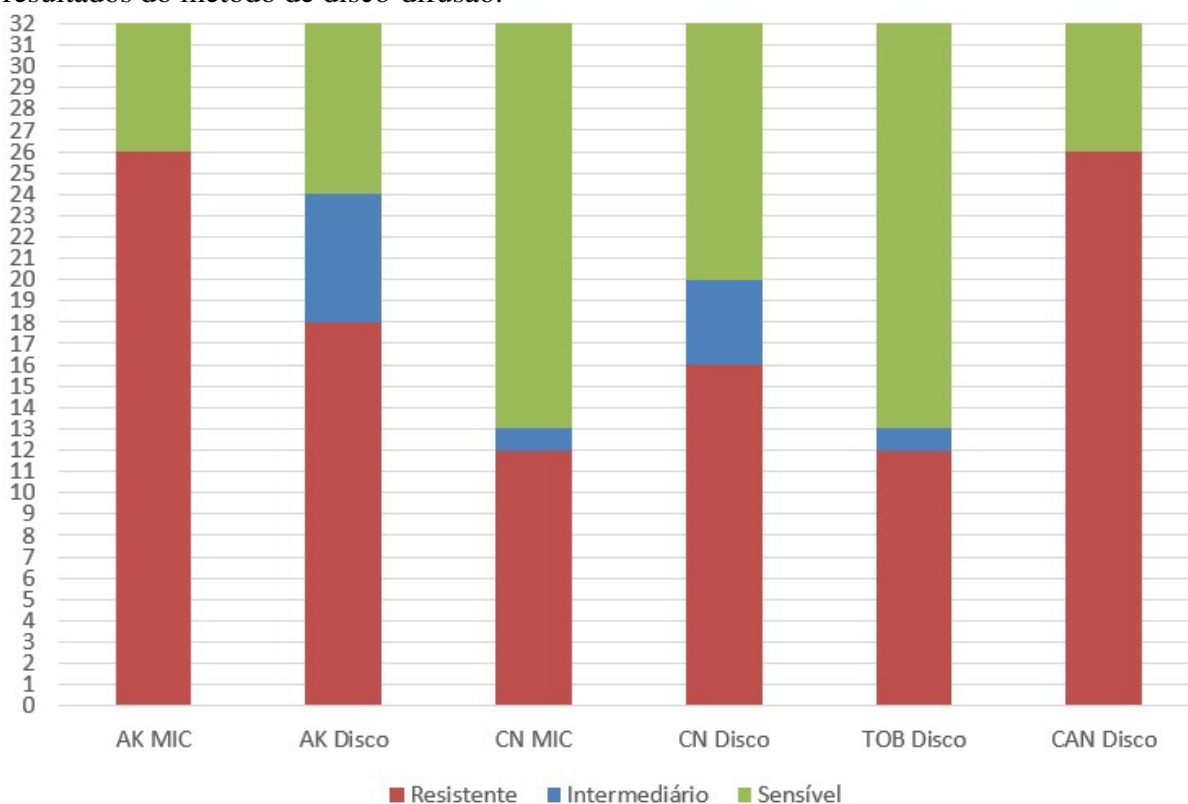
A **Tabela 2** mostra os resultados quantitativos dos testes de suscetibilidade aos aminoglicosídeos por disco-difusão e microdiluição. Já a **Figura 5** mostra o perfil qualitativo de suscetibilidade aos aminoglicosídeos, comparando os métodos de microdiluição e disco-difusão para Amicacina e Gentamicina e apenas os valores de disco-difusão para Tobramicina e Canamicina.

Tabela 2 - Perfil quantitativo de suscetibilidade aos aminoglicosídeos com os valores de CIM ($\mu\text{g/mL}$) e de diâmetro do halo (mm) para os isolados de *A. baumannii* deste estudo.

Isolado	Perfil de Suscetibilidade aos Aminoglicosídeos					
	AK		CN		TOB	CAN
	CIM	Diâmetro do	CIM	Diâmetro do	Diâmetro do	Diâmetro do
	($\mu\text{g/mL}$)	halo (mm)	($\mu\text{g/mL}$)	halo (mm)	halo (mm)	halo (mm)
	S $\leq$ 16 R $\geq$ 64	S $\geq$ 17 R $\leq$ 14	S $\leq$ 4 R $\geq$ 16	S $\geq$ 15 R $\leq$ 12	S $\geq$ 15 R $\leq$ 12	S $\geq$ 18 R $\leq$ 13
Ac 151	R	R (11)	R ($\geq$ 16)	R (5)	R (5)	R (5)
Ac 152	R	R (12)	R ($\geq$ 16)	R (5)	R (5)	R (5)
Ac 153	R	R (11)	R ($\geq$ 16)	R (5)	R (5)	R (5)
Ac 154	S	S (19)	S ($\leq$ 1)	S (15)	S (18)	S (20)
Ac 155	R	R (14)	S ($\leq$ 2)	S (16)	S (18)	R (5)
Ac 156	S	S (7)	S ($\leq$ 1)	R (5)	R (7)	R (5)
Ac 157	R	R (13)	R ($\geq$ 16)	R (5)	R (5)	R (5)
Ac 158	R	I (16)	S	S (17)	S (18)	R (8)
Ac 159	R	S (23)	S	S (21)	S (21)	S (23)
Ac 160	S	S (25)	S	S (20)	S (20)	S (25)
Ac 161	S	S (18)	S ($\leq$ 1)	S (19)	S (18)	S (19)
Ac 162	S	I (15)	S	S (16)	S (17)	R (8)
Ac 163	R	R (10)	I	R (12)	S (15)	R (5)
Ac 164	R	R (9)	S (2)	R (9)	S (15)	R (5)
Ac 165	R	R (10)	R ($\geq$ 16)	I (13)	S (15)	R (5)
Ac 166	R	R (9)	S (2)	R (12)	S (15)	R (5)
Ac 167	R	S (19)	S (4)	S (15)	S (17)	R (8)
Ac 168	R	R (11)	R ($\geq$ 16)	R (5)	R (5)	R (5)
Ac 169	R	I (15)	S ($\leq$ 1)	S (19)	S (20)	R (9)
Ac 170	R	R (12)	R ($\geq$ 16)	R (5)	R (5)	R (5)
Ac 171	R	R (8)	S (2)	R (12)	R (5)	R (5)
Ac 172	R	R (8)	S (2)	I (13)	S (15)	R (5)
Ac 173	R	R (11)	S (4)	I (13)	S (15)	R (5)
Ac 174	R	R (12)	R ($\geq$ 16)	R (5)	R (5)	R (5)
Ac 175	R	I (15)	S ($\leq$ 1)	S (17)	S (19)	S (18)
Ac 176	R	S (17)	R ($\geq$ 16)	R (5)	S (16)	R (5)
Ac 177	S	S (17)	R ($\geq$ 16)	R (5)	I (14)	R (5)
Ac 178	R	I (15)	S	S (19)	S (20)	R (7)
Ac 179	R	R (12)	R ($\geq$ 16)	R (5)	R (7)	R (5)
Ac 180	R	R (12)	S	I (13)	R (12)	R (5)
Ac 181	R	R (7)	R ($\geq$ 16)	R (8)	R (5)	R (5)
Ac 182	R	I (15)	S	S (19)	S (19)	S (18)

AK: Amicacina; CN: Gentamicina; CAN: Canamicina; TOB: Tobramicina; I: resistência intermediária ao antimicrobiano testado; R: resistência ao antimicrobiano testado; S: sensibilidade ao antimicrobiano testado.

Figura 5 - Perfil qualitativo de suscetibilidade aos aminoglicosídeos elaborado a partir dos resultados do método de disco-difusão.



AK MIC: Suscetibilidade à Amicacina por Microdiluição; AK Disco: Suscetibilidade à Amicacina por disco-difusão; CN MIC: Suscetibilidade à Gentamicina por Microdiluição; CN Disco: Suscetibilidade à Gentamicina por disco-difusão; TOB Disco: Suscetibilidade à Tobramicina por disco-difusão; CAN Disco: Suscetibilidade à Canamicina por disco-difusão;

Com relação aos antimicrobianos Tobramicina e Canamicina, não testados pela metodologia de microdiluição, observou-se frequências de 40,6% (13/32) e 81,25% (26/32) de isolados não-suscetíveis, pelo teste de disco-difusão, respectivamente. Um estudo da Romênia aponta uma frequência de resistência à Tobramicina menor (35,6%) entre isolados clínicos de *A. baumannii* (MOISOIU et al., 2014). No Irã, foi observada uma frequência mais elevada de resistência, de 69,3% (AGAZADEH et al., 2013). Por outro lado, um estudo da China relatou 11,5% de resistência à Tobramicina em isolados de UTIs, valor bem inferior ao do presente estudo (MA et al., 2013).

A maioria dos isolados do atual estudo foi resistente à Canamicina (81,25%). O mesmo estudo do Irã citado anteriormente observou também altas taxas de resistência (93,3%) a este antimicrobiano (AGAZADEH et al., 2013). Apesar de não ser frequentemente prescrita (FISHBAIN; PELEG, 2010), neste estudo a suscetibilidade à Canamicina foi avaliada para o entendimento do perfil geral de suscetibilidade aos aminoglicosídeos e da relação entre o fenótipo de resistência e presença de genes de AMEs.

De acordo com a **Figura 5**, é possível observar diferenças com relação ao número e porcentagem de isolados resistentes, sensíveis e com resistência intermediária à Amicacina e Gentamicina, quando são comparados os métodos de microdiluição e disco-difusão. Para Amicacina, observam-se maiores taxas de isolados intermediários no método disco-difusão, assim como para Gentamicina. Com relação aos isolados sensíveis e resistentes, houve resultados diferentes para estes dois antimicrobianos. A frequência de isolados resistentes diminuiu e de sensíveis aumentou para Amicacina no método disco-difusão comparado ao de microdiluição. Já para Gentamicina ocorreu o contrário, com maior frequência de isolados resistentes no método disco-difusão e diminuição dos sensíveis.

Os valores de p obtidos pelo Teste Exato de Fisher na comparação entre as metodologias de microdiluição e disco-difusão para os antimicrobianos Amicacina e Gentamicina foram 0,38 e 0,97, respectivamente. Desse modo, as diferenças entre as metodologias para estes dois antimicrobianos não foram significativas, apesar das diferenças que ocorreram entre estes.

As diferenças de suscetibilidade visualizadas entre as duas metodologias demonstram que ambas apresentam limitações. Gilad e colaboradores (2006) já haviam reportado que *A. baumannii* multirresistentes requerem metodologias manuais de suscetibilidade com E-test e disco-difusão quando testados pelo sistema automatizado Vitek 2[®] (Biomérieux, France). Além disso, a maioria dos *A. baumannii* apresenta erros de falsa suscetibilidade ou falsa resistência à Amicacina, o que justifica sua verificação (GILAD; SCHWARTZ, 2008).

Nos testes de suscetibilidade que utilizam meios à base de ágar, o tamanho das zonas de inibição depende de muitos fatores variáveis, como o tipo de agente antimicrobiano, concentração do antimicrobiano no disco e tamanho do inóculo. A variável mais crítica é o meio de cultura (LO-TEN-FOE, et al., 2007). Um estudo da década de 1970, que analisou a metodologia de disco-difusão, demonstrou que testes realizados com *Pseudomonas aeruginosa* em diferentes lotes de ágar Mueller-Hinton apresentaram variações nos resultados de suscetibilidade à Gentamicina, e que compostos catiônicos (exceto Ca^{2+} , Mg^{2+} e Zn^{2+}) presentes no meio interagem com os aminoglicosídeos, influenciando em sua atividade (POLLOCK et al., 1978). Outro estudo também verificou diferenças de desempenho entre meios de cultura diferentes no teste de suscetibilidade a aminoglicosídeos, Imipenem e Colistina (ANDREWS; WALKER; KING, 2002).

5.3.3 Perfil de Resistência aos Antimicrobianos

A partir das **Tabelas 1 e 2**, que detalharam o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos testados, foi elaborado o **Quadro 10**, com os perfis de resistência aos antimicrobianos, considerando os resultados de disco-difusão para os quatro aminoglicosídeos (AK, CN, TOB e CAN) e CIM ($\mu\text{g/mL}$) para os onze antimicrobianos testados por microdiluição (CAZ, FEP, CRO, IPM, MEM, SAM, TZP, CIP, PB, COL e TIG). Além disso, os isolados resistentes e intermediários foram agrupados como não-suscetíveis.

Assim, foram observados dezesseis perfis de resistência entre os 32 isolados deste estudo, mostrados no **Quadro 10**.

Quadro 10 - Resumo do perfil de resistência de *A. baumannii* deste estudo.

Perfil de Resistência*	Número de isolados com o perfil	Porcentagem dos isolados
AK, CN, TOB, CAN, CAZ, FEP, CRO, IPM, MEM, SAM, TZP, CIP, TIG	9	28,13%
AK, CN, CAN, CAZ, FEP, CRO, IPM, MEM, SAM, TZP, CIP	4	12,50%
AK, CAN, CAZ, FEP, CRO, IPM, MEM, SAM, TZP, CIP	4	12,50%
CAZ, FEP, CRO, IPM, MEM, SAM, TZP, CIP	3	9,38%
AK, CAZ, FEP, CRO, IPM, MEM, SAM, TZP, CIP	1	3,13%
AK, CAZ, FEP, CRO, IPM, MEM, TZP, CIP	1	3,13%
AK, CN, CAN, CAZ, FEP, CRO, IPM, MEM, SAM, TZP, CIP, TIG	1	3,13%
AK, CN, CAN, CAZ, FEP, CRO, IPM, MEM, TZP, CIP, TIG	1	3,13%
AK, CN, TOB, CAN, CAZ, FEP, CRO, IPM, MEM, SAM, TZP, CIP	1	3,13%
AK, CAN, CAZ, FEP, CRO, IPM, MEM, SAM, TZP, CIP, PB, COL	1	3,13%
CN, CAN, CAZ, FEP, CRO, IPM, MEM, SAM, TZP, CIP, TIG	1	3,13%
AK, CN, TOB, CAN, CAZ, FEP, CRO, IPM, MEM, SAM, TZP, CIP, COL, TIG	1	3,13%
CN, TOB, CAN, CAZ, FEP, CRO, IPM, MEM, SAM, TZP, CIP, PB, COL, TIG	1	3,13%
CN, TOB, CAN, CRO	1	3,13%
CRO	1	3,13%
CAN, CAZ, FEP, CRO, IPM, MEM, SAM, TZP, CIP	1	3,13%

AK: Amicacina; CN: Gentamicina; CAN: Canamicina; TOB: Tobramicina; CAZ: Ceftazidima; FEP: Cefepime; CRO: Ceftriaxona; IPM: Imipenem; MEM: Meropenem; SAM: Ampicilina/Sulbactam; TZP: Piperacilina/Tazobactam; CIP: Ciprofloxacina; PB: Polimixina B; COL: Colistina; TIG: Tigeciclina.

O perfil mais frequente ocorreu em 28,13% (9/32) dos isolados, sendo caracterizado pela resistência aos antimicrobianos AK, CN, TOB, CAN, CAZ, FEP, CRO, IPM, MEM, SAM, TZP, CIP, TIG. Seguindo a ordem decrescente de frequência, outros dois perfis, com quatro isolados cada, ocorreram em 12,5% (4/32) dos isolados: AK, CN, CAN, CAZ, FEP, CRO, IPM, MEM, SAM, TZP, CIP e AK, CAN, CAZ, FEP, CRO, IPM, MEM, SAM, TZP, CIP. Depois, está o perfil CAZ, FEP, CRO, IPM, MEM, SAM, TZP, CIP com ocorrência de 9,38% (3/32).

Além dos perfis de resistência mais frequentes, outros doze perfis ocorreram com menor frequência entre os isolados de *A. baumannii* (3,13%). Dentro deste grupo encontra-se

um perfil caracterizado pela resistência apenas à Ceftriaxona (CRO), correspondendo ao isolado de *A. baumannii* menos resistente do estudo.

Segundo Magiorakos e colaboradores (2012), o conceito de bactérias multirresistentes refere-se a isolados que apresentam resistência a três ou mais classes de antimicrobianos. Apenas um isolado (3,13%) do presente estudo apresentou resistência a um único antimicrobiano (CRO) e outro (3,13%) apresentou resistência à quatro antimicrobianos (CN, TOB, CAN, CRO). Os demais (93,74%) apresentaram resistência a no mínimo oito antimicrobianos distribuídos em três classes, caracterizando uma alta frequência de isolados multirresistentes.

Estudos na literatura já revelaram diferentes porcentagens de isolados de *A. baumannii* multirresistentes. Um estudo dos Estados Unidos relatou a porcentagem de 72% de isolados clínicos de *A. baumannii* multirresistentes (DENT et al., 2010) enquanto outro do Irã revelou 94,4% dos isolados multirresistentes, o que é uma porcentagem semelhante ao presente estudo (HOJABRI et al., 2014). Na Itália, pesquisadores encontraram 54% e a maioria destes apresentaram resistência a quatro classes de antimicrobianos (DE FRANCESCO et al., 2013). Além disso, um estudo brasileiro do interior do estado de São Paulo encontrou, em 88,8% dos isolados com características de multirresistência (CLÍMACO, 2011).

5.3.4 Comparação das Suscetibilidades aos Antimicrobianos apresentadas por Isolados de 2012 e 2014

Um estudo anterior (POLOTTO, 2014), realizado no mesmo hospital com cem isolados clínicos de *A. baumannii* coletados em 2012, revelou resultados semelhantes ao presente estudo, com relação à maior frequência de resistência aos antimicrobianos Ceftazidima (CAZ), Cefepime (FEP), Imipenem (IPM), Meropenem (MEM), Piperacilina/Tazobactam (TZP) e Ciprofloxacina (CIP), aos quais as frequências de resistência foram 100% (POLOTTO, 2014) e 93,7% no presente estudo.

Outra semelhança entre os resultados dos estudos foi a maior frequência de sensibilidade aos antimicrobianos Polimixina B (PB) e Colistina (COL), correspondendo a 98% nos isolados de 2012 e, nos isolados de 2013/2014, 92,6% e 90,6%, respectivamente. Entretanto, já se observa uma diminuição na sensibilidade a estes dois antimicrobianos (de 98% em 2012 para 92,6% e 90,6% em 2014). Esta pode ser uma indicação de emergência de cepas resistentes à PB e COL, pois o número de isolados de 2014 é menor. Desse modo, a

suscetibilidade a estes antimicrobianos deve continuar sendo testada nos isolados de *A. baumannii* para monitorar a evolução de suas taxas de resistência.

Algumas diferenças foram observadas entre esses dois estudos com relação à resistência à Amicacina, Gentamicina e Ampicilina/Sulbactam. No estudo de 2012, 68% dos isolados foram resistentes à Amicacina e 22% à Gentamicina. No presente estudo, foram observadas frequências maiores de resistência a estes antimicrobianos, 81,2% e 40,6%, respectivamente. A resistência à Ampicilina/Sulbactam também apresentou frequência maior, com 62% em 2012 e 93,3% em 2013/2014.

Outra diferença entre estes dois estudos refere-se à porcentagem de isolados não-suscetíveis à Tigeciclina. Enquanto em 2012 foram encontrados 12% dos isolados com resistência intermediária, em 2013/2014 foi observada uma frequência maior (43,7%). Esse fato pode ser decorrente do crescente uso de Tigeciclina no tratamento de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos, enfatizando a necessidade da combinação eficaz desta droga com outros agentes antimicrobianos (DONG et al., 2014). Com estes resultados destaca-se a emergência de cepas não-suscetíveis a este antimicrobiano no HB e a necessidade de monitorar a evolução das taxas de resistência.

Com estes resultados comparativos de 2012 e 2013/2014, observaram-se vários fatos relevantes de semelhanças e diferenças entre os isolados clínicos de *A. baumannii* desses estudos. As comparações realizadas demonstram a importância de estudos consecutivos para o melhor entendimento da dinâmica do perfil de resistência aos antimicrobianos de isolados clínicos de *A. baumannii* do HB.

5.4 Investigação de Genes de AMEs

5.4.1 Frequência de Genes e Genótipos de AMEs

Entre os sete genes de AMEs investigados, foram detectados cinco, em 87,5% (28/32) dos isolados. Os genes encontrados foram das fosfotransferases *aph(3')-VI* e *aph(3')-Ia* e os genes das acetiltransferases *aac(6')-Ib*, *aac(3)-Ia* e *aac(3)-IIa*, como ilustrado na **Figura 6**. As frequências dos genes de AMEs e dos genótipos de AMEs estão resumidas nas **Figuras 7** e **8**, respectivamente.

Figura 6 - Imagem do gel de agarose a 1%, resultante de eletroforese mostrando os produtos de amplificação dos genes de AMEs. Gel 1: Reação Triplex 1, Triplex 2 e Duplex com as mesmas amostras Ac 151 (1), Ac 152 (2), Ac 153 (3) e Ac 163 (4); Controles de Amplificação C1: Ac 157 carreador do gene *aac(3)-Ia* (372 pb), C2: Ac 164 carreador do gene *aph(3')-VI* (716 pb) e Cd: Ac 168 carreador dos genes *aph(3')-Ia* (623 pb) e *aac(6')-Ib* (395 pb). Gel 2: Reação Triplex 1 com as amostras Ac 40 (5), Ac 41 (6), Ac 86 (7), Ac 155 (8) e Ac 158 (9); Controle de Amplificação C1: Ac 157 carreador do gene *aac(3)-Ia* (372 pb). M, marcador de peso molecular 100 pb; Br: Controle Negativo.

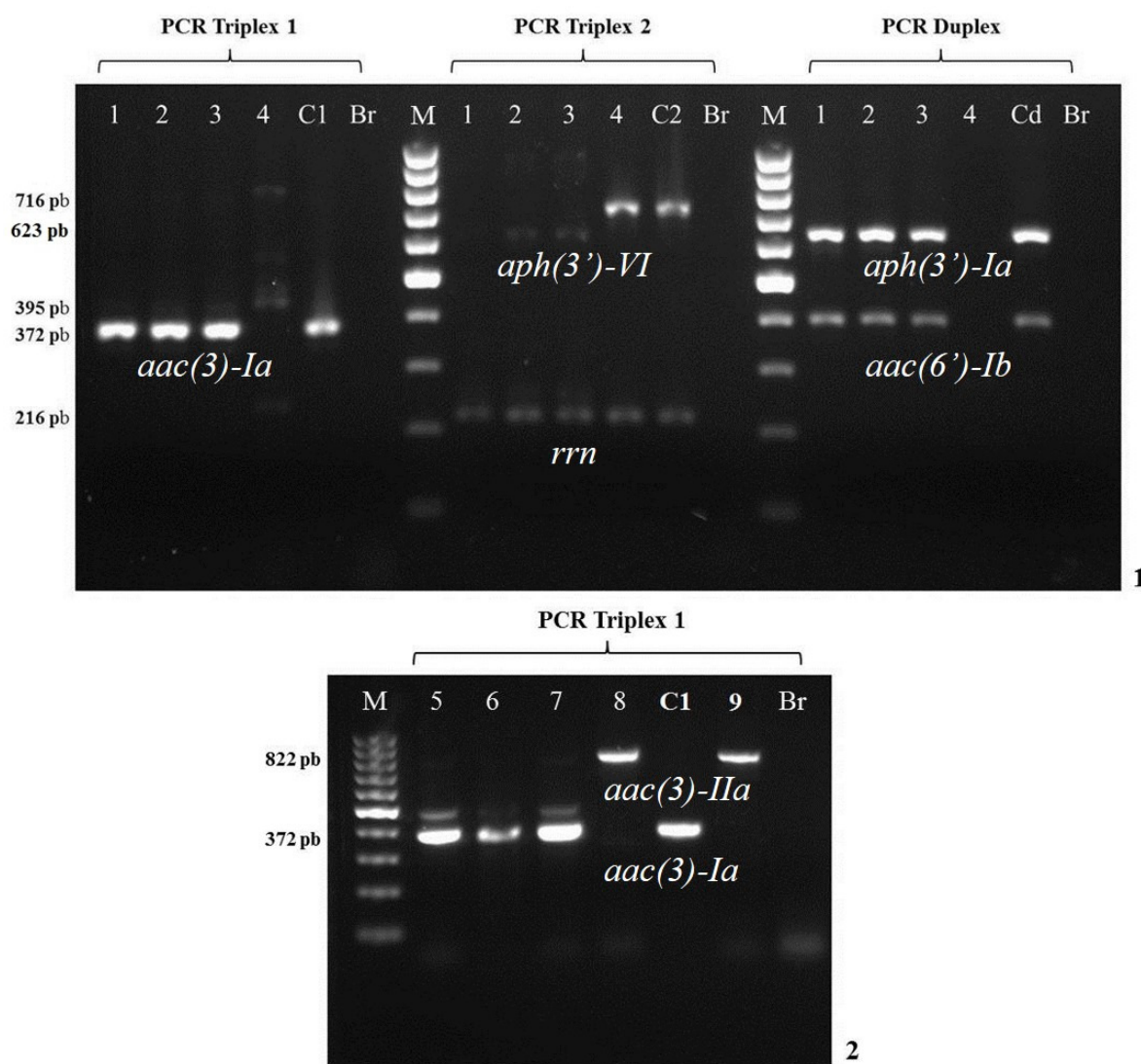


Figura 7 - Frequência de isolados de *A. baumannii* carreadores de genes de AMEs.

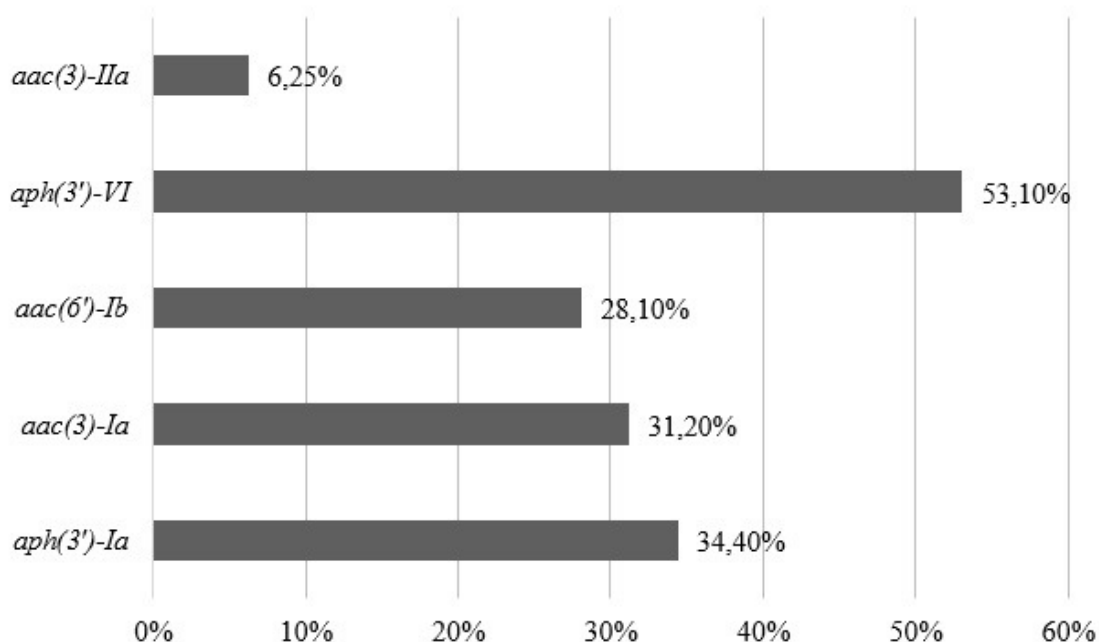
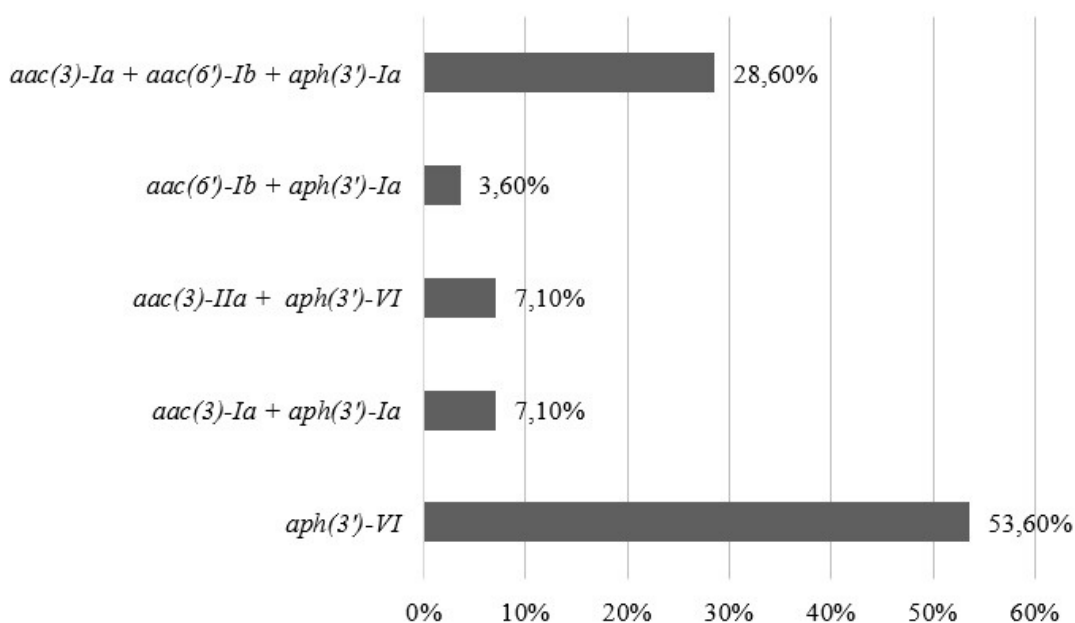


Figura 8 - Frequência de isolados de *A. baumannii* carreadores de diferentes combinações de AMEs.



Entre os genes de AMEs detectados no atual estudo, o mais frequente foi *aph(3')-VI* (53,1%), seguido por *aph(3')-Ia* (34,4%), *aac(3)-Ia* (31,2%), *aac(6')-Ib* (28,1%) e *aac(3)-IIa* (6,25%). Os genes de acetiltransferases *aac(6')-Ih* e de nucleotidiltransferases *ant(2')-Ia* não foram detectados.

Entre os 28 isolados carreadores de genes de AMEs, 53,6% (15/28) apresentaram apenas um gene, sendo este o da fosfotransferase *aph(3')-VI*. Dois genes de AMEs foram

encontrados em 17,8% (5/28) dos *A. baumannii*, incluindo as associações *aac(3)-Ia* + *aph(3')-Ia* (7,1%), *aac(3)-IIa* + *aph(3')-VI* (7,1%) e *aac(6')-Ib* + *aph(3')-Ia* (3,6%). Apenas um trio de genes em associação foi encontrado no atual estudo, representado pelos genes *aac(3)-Ia* + *aac(6')-Ib* + *aph(3')-Ia* detectados em 28,6% (8/28) dos isolados. Além disso, quatro isolados (Ac 154, Ac 156, Ac 160 e Ac 161) não apresentaram os genes de AMEs investigados, correspondendo a 12,5% do total. Dentre estes, 75% (3/4) apresentaram sensibilidade a todos aminoglicosídeos testados por disco-difusão e 25% (1/4) foi sensível apenas à Amicacina (Tabela 13). Estes dados sugerem a presença de outros genes não testados, como *aac(2')-Ib* e *aac(6')-II*, assim como outros mecanismos de resistência tais como a expressão de bombas de efluxo AdeABC do sistema RND (FERNÁNDEZ; HANCOCK, 2012; MAGNET; COURVALIN; LAMBERT, 2001; RAMIREZ; TOLMASKY, 2010).

Em um estudo do Irã (AGAZADEH et al., 2013) com 75 isolados clínicos de *A. baumannii*, foram encontraram genes de acetiltransferases, nucleotíditransferases e fosfotransferases, sendo os mais comuns *aph(3')-VI*, *ant(2')-Ia* (não encontrado no atual estudo), *aph(3')-Ia* e *aac(6')-Ib*. Estes resultados são consistentes com o do presente estudo, que também detectou *aph(3')-VI* e *aph(3')-Ia* como os mais prevalentes. O estudo citado revelou associação de até cinco genes de AMEs, sendo a maior frequência de isolados (45,3%) com dois genes, seguido de 22,6% dos isolados que tiveram três genes, 17,3% com um gene, 5,3% com quatro genes e 4% com cinco genes. No referido estudo não foi encontrado o gene *aac(3)-IIa*, o qual foi detectado no atual estudo.

Na Europa, os genes de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos mais encontrados são *aac(3)-I*, *aac(3)-II*, *aac(6')-Ib*, *aph(3')-I*, and *ant(3'')-I* (NEMEC et al., 2004). Diferentemente deste padrão europeu, o presente estudo detectou elevada prevalência do gene *aph(3')-VI*. A alta capacidade de inativação da amicacina por APH(3')VI foi constatada por Lambert e colaboradores em 1990. A partir disso, a existência de *A. baumannii* carreadoras de *aph(3')-VI* em outras partes do mundo tem sido descrita com frequência, como em estudos realizados nos Estados Unidos, Coreia do Sul e Espanha, que encontraram taxas de 4,7% (AKERS et. al., 2010), 10% (CHO et. al., 2009) e 28% (VILA et. al., 1993), respectivamente. Além disso, no atual estudo foi registrada a ocorrência do gene *aac(3)-IIa* em 6,25% dos isolados, caracterizando uma diferença comparada a elevada prevalência deste gene na Europa (NEMEC et al., 2004) e semelhança com um estudo norte-americano que relatou 3,7% deste gene em seus isolados (AKERS et. al., 2010).

5.4.2 Verificação da Correspondência da Presença de Genes AMEs e Resistência Fenotípica aos Aminoglicosídeos

A **Tabela 3** mostra a distribuição de genes de AMEs e seus respectivos fenótipos de suscetibilidade aos aminoglicosídeos Amicacina, Gentamicina, Tobramicina e Canamicina testados por disco-difusão. A **Tabela 4** resume a frequência dos genes de AMEs, especificidade de substratos das enzimas e valores de *p* obtidos.

Tabela 3 - Distribuição de genes de resistência aos aminoglicosídeos e seus respectivos fenótipos de suscetibilidade à Amicacina, Gentamicina, Tobramicina e Canamicina.

Isolados	Fenótipos (disco-difusão)				Genes Encontrados
	AK	CN	TOB	CAN	
Ac 151	R (11)	R (5)	R (5)	R (5)	<i>aac(3)-Ia ; aac(6')-Ib ; aph(3')-Ia</i>
Ac 152	R (12)	R (5)	R (5)	R (5)	<i>aac(3)-Ia ; aac(6')-Ib ; aph(3')-Ia</i>
Ac 153	R (11)	R (5)	R (5)	R (5)	<i>aac(3)-Ia ; aac(6')-Ib ; aph(3')-Ia</i>
Ac 154	S (19)	S (15)	S (18)	S (20)	-
Ac 155	R (14)	S (16)	S (18)	R (5)	<i>aac(3)-IIa ; aph(3')-VI</i>
Ac 156	S (7)	R (5)	R (7)	R (5)	-
Ac 157	R (13)	R (5)	R (5)	R (5)	<i>aac(3)-Ia ; aac(6')-Ib ; aph(3')-Ia</i>
Ac 158	I (16)	S (17)	S (18)	R (8)	<i>aac(3)-IIa ; aph(3')-VI</i>
Ac 159	S (23)	S (21)	S (21)	S (23)	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 160	S (25)	S (20)	S (20)	S (25)	-
Ac 161	S (18)	S (19)	S (18)	S (19)	-
Ac 162	I (15)	S (16)	S (17)	R (8)	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 163	R (10)	R (12)	S (15)	R (5)	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 164	R (9)	R (9)	S (15)	R (5)	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 165	R (10)	I (13)	S (15)	R (5)	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 166	R (9)	R (12)	S (15)	R (5)	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 167	S (19)	S (15)	S (17)	R (8)	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 168	R (11)	R (5)	R (5)	R (5)	<i>aac(3)-Ia ; aac(6')-Ib ; aph(3')-Ia</i>
Ac 169	I (15)	S (19)	S (20)	R (9)	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 170	R (12)	R (5)	R (5)	R (5)	<i>aac(3)-Ia ; aac(6')-Ib ; aph(3')-Ia</i>
Ac 171	R (8)	R (12)	R (5)	R (5)	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 172	R (8)	I (13)	S (15)	R (5)	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 173	R (11)	I (13)	S (15)	R (5)	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 174	R (12)	R (5)	R (5)	R (5)	<i>aac(3)-Ia ; aac(6')-Ib ; aph(3')-Ia</i>
Ac 175	I (15)	S (17)	S (19)	S (18)	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 176	S (17)	R (5)	S (16)	R (5)	<i>aac(3)-Ia ; aph(3')-Ia</i>
Ac 177	S (17)	R (5)	I (14)	R (5)	<i>aac(3)-Ia ; aph(3')-Ia</i>
Ac 178	I (15)	S (19)	S (20)	R (7)	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 179	R (12)	R (5)	R (7)	R (5)	<i>aac(3)-Ia ; aac(6')-Ib ; aph(3')-Ia</i>
Ac 180	R (12)	I (13)	R (12)	R (5)	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 181	R (7)	R (8)	R (5)	R (5)	<i>aac(6')-Ib ; aph(3')-Ia</i>
Ac 182	I (15)	S (19)	S (19)	S (18)	<i>aph(3')-VI</i>

R: Resistente; I: Intermediário; S: Sensível; AK: Amicacina; CN: Gentamicina; CAN: Canamicina; TOB: Tobramicina.

Tabela 4 - Frequência de genes de AMEs, especificidade de substratos das enzimas e valores de *p* obtidos para os aminoglicosídeos Amicacina, Gentamicina, Tobramicina e Canamicina.

Genes de AMEs	N (%) de Isolados <i>n</i> =32	Substrato da Enzima	Concordância Gene-Fenótipo de AMEs Valores de <i>p</i>			
			AK	CN	TOB	CAN
<i>aac(3)-IIa</i>	2 (6,25)	CN, TOB	-	1,000	1,000	-
<i>aph(3')-VI</i>	17 (53,1)	AK, CAN	0,146	-	-	0,608
<i>aac(6')-Ib</i>	9 (28,1)	AK, TOB, CAN	0,046	-	2,54 . 10⁻⁵	0,111
<i>aac(3)-Ia</i>	10 (31,2)	CN	-	0,002	-	-
<i>aph(3')-Ia</i>	11 (34,3)	CAN	-	-	-	0,059

AK: Amicacina; CN: Gentamicina; CAN: Canamicina; TOB: Tobramicina.

Com relação ao fenótipo não-suscetibilidade (incluindo isolados resistentes e intermediários) aos aminoglicosídeos e os genes encontrados no presente estudo, foram observados diferentes valores de *p* para cada gene e seu respectivo fenótipo de resistência, como mostra a **Tabela 4**. Entre os isolados carreadores do gene *aac(3)-IIa*, não houve significância entre a presença do gene e a expressão do fenótipo de resistência à Gentamicina e Tobramicina, pois os valores de *p* para ambos antimicrobianos foi 1,00. Isto sugere que este gene não está expresso, pois em todos os isolados que está presente ocorre suscetibilidade a ambos antimicrobianos citados. Este gene no genótipo *aac(3)-IIa* + *aph(3')-VI* também não expressa resistência à estes antimicrobianos, confirmando o observado para o gene isoladamente.

A discordância da presença do gene *aac(3)-IIa* e seu fenótipo de resistência pode ser explicada pela ocorrência de um gene críptico, isto é, uma sequência de DNA que não expressa o fenótipo (MOODLEY et al., 2013). Esta hipótese pode ser apoiada por descobertas semelhantes em *Salmonella* spp., na qual uma deleção de 60 kb foi relatada *upstream* a um gene de AME do grupo *aac(6')-I*, tornando o gene críptico altamente expresso (MAGNET;COURVALIN; LAMBERT, 1999).

Também não foram encontrados resultados significantes entre a presença dos genes *aph(3')-VI*, *aph(3')-Ia* e *aac(6')-Ib* (resistência à Canamicina) e seus respectivos fenótipos de resistência. Akers e colaboradoras (2010) já haviam observado que o genótipo AME pode não ser um indicador adequado para o fenótipo de resistência. Estes autores relataram discordâncias frequentes entre o fenótipo previsto e o observado, sendo que apenas em 8,4% estes se encontravam concordantes. Além disso, outro estudo não encontrou significância nas relações das AMEs com os fenótipos de resistência aos aminoglicosídeos (AGAZADEH et al., 2013).

Por outro lado, foram encontrados valores de p significantes em três casos, dois deles relacionados à presença do gene *aac(6')-Ib* e a resistência à Amicacina ($p=0,046$) e Tobramicina ($p= 2,54 \cdot 10^{-5}$). O outro caso refere-se à presença do gene *aac(3)-Ia* e a resistência à Gentamicina ($p=0,02$). Somente para Canamicina não foram encontradas correlações significantes entre a presença de genes de AMEs e a expressão do fenótipo.

O menor e mais significativo valor de p encontrado foi na correlação entre a presença do gene *aac(6')-Ib* e a resistência à Tobramicina. Um achado semelhante foi descrito por Moodley e colaboradores (2013), que encontraram boas correlações (em frequência e porcentagem) de resistência à Tobramicina e a presença do gene *aac(3)-IIa*, cujo alvo da enzima também é este antimicrobiano.

5.4.3 Comparação da Investigação de Genes de AMEs de Isolados de 2012 e 2014

No estudo de POLOTTO (2014), observou-se resultados semelhantes e poucas diferenças com o presente estudo no que se refere aos genes e genótipos de AMEs. O gene mais frequente em ambos foi *aph(3')-VI*, e *aac(3)-Ia* permaneceu com frequência semelhante (30% em 2012 e 31,2% em 2014). O gene *aac(6')-Ib* ocorreu com menor frequência em 2014 (46% em 2012 e 28,1% em 2014) e *aph(3')-Ia* teve uma maior ocorrência entre os isolados de 2014 (24% em 2012 e 34,4% em 2014).

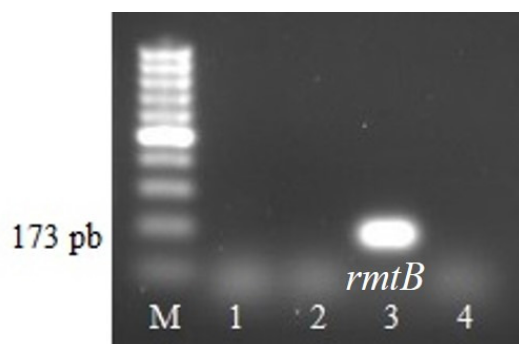
Uma novidade entre os isolados clínicos de *A. baumannii* do HB no presente estudo foi a ocorrência do gene *aac(3)-IIa* em 6,25% dos isolados, o qual não foi observado nos isolados de 2012. Entretanto, até o momento não foi possível a confirmação da ocorrência deste gene de AME nos isolados mais recentes por meio de sequenciamento gênico. Se a presença deste gene for confirmada, este será o primeiro relato da ocorrência de *aac(3)-IIa* entre *A. baumannii* isolados no Brasil, em nosso conhecimento.

Com relação aos genótipos de AMEs, ambos estudos apontaram os mesmos genótipos em ordem igual de frequência do mais ocorrente para o menos ocorrente, sendo o mais prevalente *aph(3')-VI*, seguido de *aac(3)-Ia + aac(6')-Ib + aph(3')-Ia*, *aac(3)-Ia + aph(3')-Ia* e *aac(6')-Ib + aph(3')-Ia*. Isto demonstra que neste intervalo de tempo de dois anos, a frequência de alguns genes foram alteradas, mas as frequências dos genótipos permanecem semelhantes nos isolados de *A. baumannii* do HB. Somente o genótipo *aac(3)-IIa + aph(3')-VI* não foi observado em ambos estudos devido a ausência de *aac(3)-IIa* em 2012.

5.5 Investigação de Genes de Enzimas 16S rRNA Metiltransferases

Dos três genes de 16S rRNA metiltransferases investigados (*armA*, *rmtB* e *rmtC*) nenhum foi encontrado, o que demonstra a ausência destes mecanismos de resistência nos isolados de *A. baumannii* deste estudo. A **Figura 9** mostra o resultado da eletroforese amostral, com alguns isolados para demonstração, em gel de agarose para a investigação destes genes de metilases.

Figura 9 - Imagem do gel amostral de agarose a 1%, resultante de eletroforese mostrando o resultado da PCR para as 16S rRNA Metiltransferases. Sequência de amostras: Ac 151 (1); Ac 152 (2); Controle positivo de *Klebsiella pneumoniae* para o gene *rmtB* (3); Controle Negativo (4).



5.6 Tipagem Molecular de *A. baumannii*

5.6.1 Tipagem Molecular de *A. baumannii* em Isolados do Presente Estudo

A tipagem molecular por meio da técnica de REP-PCR foi realizada em 31 isolados clínicos de *A. baumannii*. Apenas um isolado do presente estudo (Ac 180) não foi tipável. A **Figura 10** ilustra a o resultado da eletroforese em gel de agarose para a tipagem molecular dos isolados do atual estudo. A similaridade genética das cepas foi analisada após a construção de um dendrograma gerado pelo software BioNumerics (Applied Maths, Saint-Martens-Latem, Bélgica) (**Figura 11**).

Figura 10 - Imagem do gel de agarose a 1,5%, resultante de eletroforese mostrando o resultado da tipagem molecular dos isolados de *A. baumannii* por meio da técnica de REP-PCR. 1: Ac 151; 2: Ac 152; 3: Ac 153; 4: Ac 154; 5: Ac 155; 6: Ac 156; 7: Ac 157; 8: Ac 158; 9: Ac 159; 10: Ac 160; 11: Ac 161; 12: Ac 162; 13: Ac 163; 14: Ac 164; 15: Ac 165; 16: Ac 166; 17: Ac 167; 18: Ac 168; M: marcador de peso molecular 1Kb.

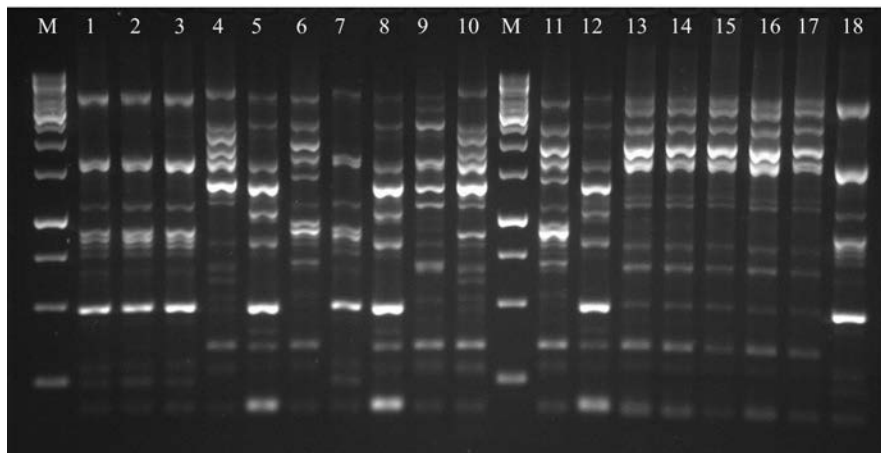
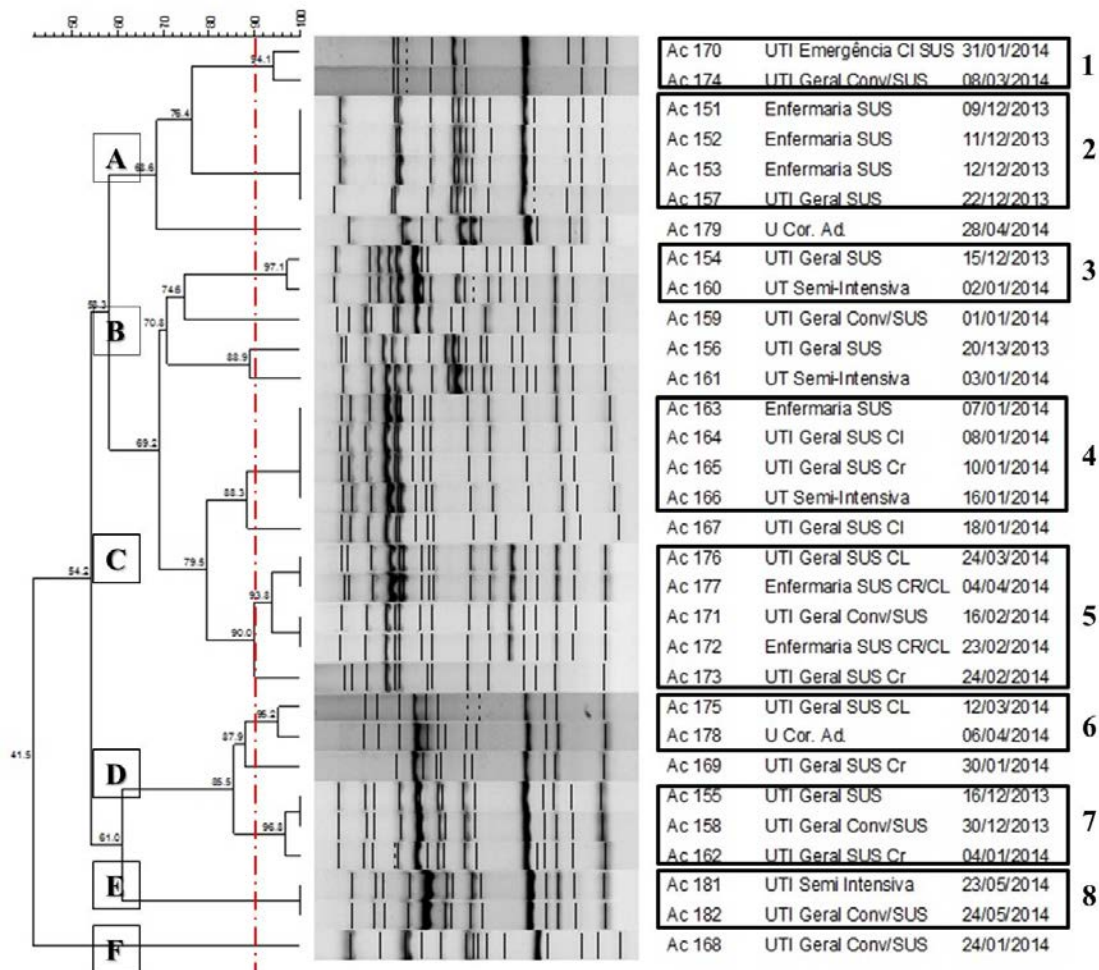


Figura 11 - Dendrograma com os perfis de REP-PCR de 31 isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii*. [A linha vermelha traça o limite de similaridade ($\geq 90\%$), considerada para a formação de *clusters* no dendrograma.] 1-8: 8 *clusters*. A – F: grupos genéticos.



Os 31 isolados, amplamente disseminados na instituição, inclusive em UTIs, foram distribuídos em oito *clusters*. Isolados com similaridade $\geq 90\%$ foram agrupados no mesmo *cluster*. Além disso, os isolados foram divididos em seis grupos nos quais estão geneticamente relacionados (A – F), conforme observado no dendrograma da **Figura 11**.

Os **Quadros 11 e 12** resumem as características dos isolados clínicos de *A. baumannii* deste estudo, anteriormente referidas e discutidas. Estes quadros auxiliaram na interpretação do dendrograma de acordo com os grupos e *clusters*.

Quadro 11 - Resumo das características dos isolados de *Acinetobacter baumannii* de acordo com o agrupamento do dendrograma de REP-PCR (Figura 11).

Grupo/Cluster	Similaridade Genética (%)	Data	Unidade de Internação	Isolado	Perfil de Resistência	Genes AMEs
A/1	94,1	31/01/2014	UTI Emergência CI SUS	Ac 170	AK, CN, TOB, CAN, CAZ, FEP, CRO, IPM, MEM, SAM, TZP, CIP, TIG	<i>aac(3)-Ia ; aac(6')-Ib ; aph(3')-Ia</i>
A/1	94,1	08/03/2014	UTI Geral Conv/SUS	Ac 174	AK, CN, TOB, CAN, CAZ, FEP, CRO, IPM, MEM, SAM, TZP, CIP, TIG	<i>aac(3)-Ia ; aac(6')-Ib ; aph(3')-Ia</i>
A/2	100	09/12/2013	Enfermaria SUS	Ac 151	AK, CN, TOB, CAN, CAZ, FEP, CRO, IPM, MEM, SAM, TZP, CIP, TIG	<i>aac(3)-Ia ; aac(6')-Ib ; aph(3')-Ia</i>
A/2	100	11/12/2013	Enfermaria SUS CR/CL	Ac 152	AK, CN, TOB, CAN, CAZ, FEP, CRO, IPM, MEM, SAM, TZP, CIP, TIG	<i>aac(3)-Ia ; aac(6')-Ib ; aph(3')-Ia</i>
A/2	100	12/12/2013	Enfermaria SUS CR/CL	Ac 153	AK, CN, TOB, CAN, CAZ, FEP, CRO, IPM, MEM, SAM, TZP, CIP, TIG	<i>aac(3)-Ia ; aac(6')-Ib ; aph(3')-Ia</i>
A/2	100	22/12/2013	UTI Geral SUS CL	Ac 157	AK, CN, TOB, CAN, CAZ, FEP, CRO, IPM, MEM, SAM, TZP, CIP, TIG	<i>aac(3)-Ia ; aac(6')-Ib ; aph(3')-Ia</i>
A	68,6	28/04/2014	U Cor. Ad.	Ac 179	AK, CN, TOB, CAN, CAZ, FEP, CRO, IPM, MEM, SAM, TZP, CIP, TIG	<i>aac(3)-Ia ; aac(6')-Ib ; aph(3')-Ia</i>
B/3	97,1	15/12/2013	UTI Geral SUS CL	Ac 154	CAZ, FEP, CRO, IPM, MEM, SAM, TZP, CIP	-
B/3	97,1	02/01/2014	UTI Semi Intensiva	Ac 160	CAZ, FEP, CRO, IPM, MEM, SAM, TZP, CIP	-
B	70,8	01/01/2014	UTI Geral Conv/SUS	Ac 159	CAZ, FEP, CRO, IPM, MEM, SAM, TZP, CIP	<i>aph(3')-VI</i>
B	70,8	20/12/2013	UTI Geral SUS CR	Ac 156	CN, TOB, CAN, CRO	-
B	70,8	03/01/2014	UTI Semi Intensiva	Ac 161	CRO	-
C/4	100	07/01/2014	Enfermaria SUS CR/CL	Ac 163	AK, CN, CAN, CAZ, FEP, CRO, IPM, MEM, TZP, CIP, TIG	<i>aph(3')-VI</i>
C/4	100	08/01/2014	UTI Geral SUS CL	Ac 164	AK, CN, CAN, CAZ, FEP, CRO, IPM, MEM, SAM, TZP, CIP	<i>aph(3')-VI</i>
C/4	100	10/01/2014	UTI Geral SUS CR	Ac 165	AK, CN, CAN, CAZ, FEP, CRO, IPM, MEM, SAM, TZP, CIP	<i>aph(3')-VI</i>
C/4	100	16/01/2014	UTI Semi Intensiva	Ac 166	AK, CN, CAN, CAZ, FEP, CRO, IPM, MEM, SAM, TZP, CIP	<i>aph(3')-VI</i>
C	88,3	18/01/2014	UTI Geral SUS CL	Ac 167	CAN, CAZ, FEP, CRO, IPM, MEM, SAM, TZP, CIP	<i>aph(3')-VI</i>
C/5	100	24/03/2014	UTI Geral SUS CL	Ac 176	CN, CAN, CAZ, FEP, CRO, IPM, MEM, SAM, TZP, CIP, TIG	<i>aac(3)-Ia ; aph(3')-Ia</i>
C/5	100	04/04/2014	Enfermaria SUS CR/CL	Ac 177	CN, TOB, CAN, CAZ, FEP, CRO, IPM, MEM, SAM, TZP, CIP, PB, COL, TIG	<i>aac(3)-Ia ; aph(3')-Ia</i>
C/5	100	16/02/2014	UTI Geral Conv/SUS	Ac 171	AK, CN, TOB, CAN, CAZ, FEP, CRO, IPM, MEM, SAM, TZP, CIP	<i>aph(3')-VI</i>
C/5	100	23/02/2014	Enfermaria SUS CR/CL	Ac 172	AK, CN, CAN, CAZ, FEP, CRO, IPM, MEM, SAM, TZP, CIP, TIG	<i>aph(3')-VI</i>
C/5	90	24/02/2014	UTI Geral SUS Cr	Ac 173	AK, CN, CAN, CAZ, FEP, CRO, IPM, MEM, SAM, TZP, CIP	<i>aph(3')-VI</i>
D/6	96,2	12/03/2014	UTI Geral SUS CL	Ac 175	AK, CAZ, FEP, CRO, IPM, MEM, SAM, TZP, CIP	<i>aph(3')-VI</i>
D/6	96,2	06/04/2014	U Cor. Ad.	Ac 178	AK, CAN, CAZ, FEP, CRO, IPM, MEM, SAM, TZP, CIP, PB, COL	<i>aph(3')-VI</i>
D	87,9	30/01/2014	UTI Geral SUS Cr	Ac 169	AK, CAN, CAZ, FEP, CRO, IPM, MEM, SAM, TZP, CIP	<i>aph(3')-VI</i>
D/7	100	16/12/2013	UTI Geral SUS CL	Ac 155	AK, CAN, CAZ, FEP, CRO, IPM, MEM, SAM, TZP, CIP	<i>aac(3)-IIa ; aph(3')-VI</i>
D/7	100	30/12/2013	UTI Geral Conv/SUS	Ac 158	AK, CAN, CAZ, FEP, CRO, IPM, MEM, SAM, TZP, CIP	<i>aac(3)-IIa ; aph(3')-VI</i>
D/7	96,8	04/01/2014	UTI Geral SUS CR	Ac 162	AK, CAN, CAZ, FEP, CRO, IPM, MEM, SAM, TZP, CIP	<i>aph(3')-VI</i>
E/8	100	23/05/2014	UTI Semi Intensiva	Ac 181	AK, CN, TOB, CAN, CAZ, FEP, CRO, IPM, MEM, SAM, TZP, CIP, TIG	<i>aac(6')-Ib ; aph(3')-Ia</i>
E/8	100	24/05/2014	UTI Geral Conv/SUS	Ac 182	AK, CAZ, FEP, CRO, IPM, MEM, TZP, CIP	<i>aph(3')-VI</i>
F	41,5	24/01/2014	UTI Geral Conv/SUS	Ac 168	AK, CN, TOB, CAN, CAZ, FEP, CRO, IPM, MEM, SAM, TZP, CIP, TIG	<i>aac(3)-Ia ; aac(6')-Ib ; aph(3')-Ia</i>

AK: Amicacina; CN: Gentamicina; TOB: Tobramicina; CAN: Canamicina; CAZ: Ceftazidima; FEP: Cefepime; CRO: Ceftriaxona; IPM: Imipenem; MEM: Meropenem; SAM: Ampicilina/Sulbactam; TZP: Piperacilina/Tazobactam; CIP: Ciprofloxacina; PB: Polimixina B; COL: Colistina; TIG: Tigeciclina.

Quadro 12 - Resumo das características dos isolados de *Acinetobacter baumannii*: perfil de suscetibilidade aos aminoglicosídeos por disco-difusão e microdiluição, perfil de AMEs e grupo/*cluster*.

Isolado	Perfil de Suscetibilidade aos Aminoglicosídeos						Grupo/Cluster	Genes AMEs
	AK		CN		TOB	CAN		
	CIM (µg/mL)	Diâmetro do halo (mm)	CIM (µg/mL)	Diâmetro do halo (mm)	Diâmetro do halo (mm)	Diâmetro do halo (mm)		
	S≤16 R≥64	S≥17 R≤14	S≤4 R≥16	S≥15 R≤12	S≥15 R≤12	S≥18 R≤13		
Ac 151	R	R (11)	R (≥16)	R (5)	R (5)	R (5)	A/2	<i>aac(3)-Ia ; aac(6')-Ib ; aph(3')-Ia</i>
Ac 152	R	R (12)	R (≥16)	R (5)	R (5)	R (5)	A/2	<i>aac(3)-Ia ; aac(6')-Ib ; aph(3')-Ia</i>
Ac 153	R	R (11)	R (≥16)	R (5)	R (5)	R (5)	A/2	<i>aac(3)-Ia ; aac(6')-Ib ; aph(3')-Ia</i>
Ac 154	S	S (19)	S (≤1)	S (15)	S (18)	S (20)	B/3	-
Ac 155	R	R (14)	S (≤2)	S (16)	S (18)	R (5)	D/7	<i>aac(3)-IIa ; aph(3')-VI</i>
Ac 156	S	S (7)	S (≤1)	R (5)	R (7)	R (5)	B	-
Ac 157	R	R (13)	R (≥16)	R (5)	R (5)	R (5)	A/2	<i>aac(3)-Ia ; aac(6')-Ib ; aph(3')-Ia</i>
Ac 158	R	I (16)	S	S (17)	S (18)	R (8)	D/7	<i>aac(3)-IIa ; aph(3')-VI</i>
Ac 159	R	S (23)	S	S (21)	S (21)	S (23)	B	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 160	S	S (25)	S	S (20)	S (20)	S (25)	B/3	-
Ac 161	S	S (18)	S (≤1)	S (19)	S (18)	S (19)	B	-
Ac 162	S	I (15)	S	S (16)	S (17)	R (8)	D/7	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 163	R	R (10)	I	R (12)	S (15)	R (5)	C/4	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 164	R	R (9)	S (2)	R (9)	S (15)	R (5)	C/4	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 165	R	R (10)	R (≥16)	I (13)	S (15)	R (5)	C/4	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 166	R	R (9)	S (2)	R (12)	S (15)	R (5)	C/4	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 167	R	S (19)	S (4)	S (15)	S (17)	R (8)	C	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 168	R	R (11)	R (≥16)	R (5)	R (5)	R (5)	F	<i>aac(3)-Ia ; aac(6')-Ib ; aph(3')-Ia</i>
Ac 169	R	I (15)	S (≤1)	S (19)	S (20)	R (9)	D	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 170	R	R (12)	R (≥16)	R (5)	R (5)	R (5)	A/1	<i>aac(3)-Ia ; aac(6')-Ib ; aph(3')-Ia</i>
Ac 171	R	R (8)	S (2)	R (12)	R (5)	R (5)	C/5	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 172	R	R (8)	S (2)	I (13)	S (15)	R (5)	C/5	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 173	R	R (11)	S (4)	I (13)	S (15)	R (5)	C/5	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 174	R	R (12)	R (≥16)	R (5)	R (5)	R (5)	A/1	<i>aac(3)-Ia ; aac(6')-Ib ; aph(3')-Ia</i>
Ac 175	R	I (15)	S (≤1)	S (17)	S (19)	S (18)	D/6	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 176	R	S (17)	R (≥16)	R (5)	S (16)	R (5)	C/5	<i>aac(3)-Ia ; aph(3')-Ia</i>
Ac 177	S	S (17)	R (≥16)	R (5)	I (14)	R (5)	C/5	<i>aac(3)-Ia ; aph(3')-Ia</i>
Ac 178	R	I (15)	S	S (19)	S (20)	R (7)	D/6	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 179	R	R (12)	R (≥16)	R (5)	R (7)	R (5)	A	<i>aac(3)-Ia ; aac(6')-Ib ; aph(3')-Ia</i>
Ac 180	R	R (12)	S	I (13)	R (12)	R (5)	-	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 181	R	R (7)	R (≥16)	R (8)	R (5)	R (5)	E/8	<i>aac(6')-Ib ; aph(3')-Ia</i>
Ac 182	R	I (15)	S	S (19)	S (19)	S (18)	E/8	<i>aph(3')-VI</i>

R: Resistente; I: Intermediário; S: Sensível; AK: Amicacina; CN: Gentamicina; TOB: Tobramicina; CAN: Canamicina.

Para a visualização das rotas de disseminação dos isolados clínicos de *A. baumannii* no HB, o presente estudo considerou os resultados obtidos pelos métodos de tipagem molecular, análise do perfil de resistência aos antimicrobianos e de genes de AMEs. Desse modo, foi observada disseminação horizontal de cepas entre as diversas unidades de internação da instituição.

As cepas do grupo A apresentaram o mesmo perfil de resistência e de genes de AMEs, e foram agrupadas em dois *clusters* distintos: 1 (94,1% de similaridade) e 2 (100% de similaridade). Estas cepas foram provenientes de diferentes unidades de internação e isoladas em datas distintas. As cepas do *cluster* 2, que apresentaram 100% de similaridade, foram isoladas de três diferentes pacientes internados na mesma enfermaria, dentro de um período de quatro dias, e de um paciente de UTI dez dias após o último isolamento na enfermaria. Este achado indica a disseminação horizontal, que também já foi relatada por outros autores (DALLA-COSTA et. al., 2003; MAMMINA et.al., 2012; SUNG et. al., 2012; VAN DEN BROEK et. al., 2009). Com relação ao *cluster* 1, a alta porcentagem de similaridade entre as cepas sugere a ocorrência de microevolução de um clone que se disseminou em diferentes UTIs do HB. Resultado semelhante foi relatado por Sung e colaboradores (2011) em hospital da Coreia do Sul, no qual os autores encontraram 100% de similaridade genética entre isolados de *A. baumannii*, mostrando a disseminação clonal no hospital estudado.

O grupo B apresentou cinco cepas, sendo três com o mesmo perfil de resistência. Destas três que apresentaram o mesmo perfil, apenas uma possui o gene *aph(3')-VI*. Dentro deste grupo, duas cepas estão juntas no *cluster* 3, com 97.1% de similaridade, perfis idênticos de resistência e de genes de AMEs. Novamente, isto demonstrou a disseminação de *A. baumannii* dentro das UTIs do HB, como já havia sido observado no estudo de Polotto (2014) no mesmo hospital.

O grupo C foi o maior observado neste estudo, com dez cepas, sendo nove incluídas em dois *clusters*: 4 e 5. O *cluster* 4 agrupou quatro cepas com 100% de similaridade, provenientes de diferentes unidades de internação, com os mesmos genes de AMEs e mesmo perfil de resistência, exceto para Ampicilina/Sulbactam (SAM) e Tigeciclina (TIG). Estes dados indicam uma disseminação horizontal ou fonte comum de *A. baumannii* entre a Enfermaria e as UTIs, devido ao reduzido intervalo de tempo entre as datas de isolamento. Além disso, as cepas deste *cluster* foram isoladas de materiais semelhantes (três de aspirado traqueal e uma de secreção traqueal), o que indica o estado debilitado destes pacientes, provavelmente auxiliados por ventilação mecânica, e uma possível fonte de *A. baumannii* nos aparelhos de ventilação mecânica. Bernards e colaboradores (2004), que estudaram um surto

de *A. baumannii* multirresistentes em UTIs de um hospital holandês, isolaram *A. baumannii* de poeira do interior de aparelhos de ventilação mecânica e filtros destes sistemas. Segundo os autores, esta poeira contaminada por *A. baumannii* pode ser um veículo relevante na transmissão da bactéria, e a solução para o caso foi a remoção da poeira do interior das máquinas e a troca de todos os filtros. Em outro estudo da Índia, os autores relataram um surto de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos, cuja fonte foi o umidificador das câmaras de oxigênio utilizadas em UTI pediátrica (EBENEZER et al., 2011).

Dentro do *cluster* 5, ocorreram dois agrupamentos com 100% de similaridade, indicando disseminação horizontal. Nestes dois agrupamentos, foram incluídas cepas com perfil de resistência que variou entre 11 a 14 antimicrobianos e dois perfis de AMEs distintos: *aac(3)-Ia* + *aph(3')-Ia* e *aph(3')-VI*. Estes dados sugerem a disseminação clonal associada à aquisição de genes de AMES, uma vez que estes genes possuem localização plasmidial (COX; WRIGHT, 2013).

Outro indício de disseminação horizontal foi encontrado no grupo D, *cluster* 6 (agrupado com 96,2% de similaridade), no qual estão dois isolados com o mesmo perfil de genes de AMEs, mas com perfis de resistência aos antimicrobianos distintos. Um destes isolados foi coletado em data posterior e apresenta resistência a Tobramicina, Polimixina B e Colistina, o que indica posterior modificação genética e aquisição de resistência à Tobramicina, Colistina e Polimixina B.

A Polimixina B e Polimixina E (ou Colistina) têm sido usadas com mais frequência na prática clínica, visando o tratamento de infecções causadas por *A. baumannii* multirresistentes, devido à ausência de opções terapêuticas e falta de novos antimicrobianos (DURANTE-MAGNONI; ZARRILLI, 2011). Infelizmente, o uso intenso de polimixinas em anos recentes levou à emergência de *A. baumannii* resistentes e heterorresistentes a esta classe de antimicrobianos, com taxas de 40,7% relatadas na Espanha e 30,6% na Coréia do Sul (LEAN et al., 2014).

A aquisição *in vivo* de resistência à Colistina por isolados clínicos de *A. baumannii* durante tratamento com este antimicrobiano já foi relatada em estudos recentes (KIM et al., 2014; LÓPEZ-ROJAS et al., 2013). Kim e colaboradores (2014) observaram a aquisição de resistência à Colistina via mutações no gene *pmrB*, resultando na modificação dos componentes do lipídio A. Esta aquisição *in vivo* de resistência à Colistina é significativa para o tratamento com este antimicrobiano, pois as cepas podem expressar o fenótipo de resistência a este antimicrobiano durante a sua terapia (KIM et al., 2014).

O grupo D apresentou quatro cepas com o mesmo perfil de resistência, e dentro deste ocorre o *cluster* 7, com 96,8% de similaridade. Dentro deste cluster destacaram-se duas cepas com 100% de similaridade genética, mesmo perfil de resistência e mesmo perfil de genes de AMEs (*aac(3)-IIa* + *aph(3')-VI*), único entre todos os isolados do estudo, o que também indica disseminação clonal entre as UTIs citadas, como já anteriormente observado em Polotto (2014).

Duas cepas agruparam-se no *cluster* 8 (Grupo E), com 100% de similaridade genética, mas possuem diferenças no perfil de resistência aos antimicrobianos e no genótipo de AMEs. Ac 181 foi a única cepa do estudo que apresentou o genótipo *aac(6')-Ib* + *aph(3')-Ia*. Nesse caso específico, duas cepas com 100% de similaridade não apresentaram distribuição uniforme de genes de AMEs. Considerando que genes de AMEs são localizados em elementos genéticos móveis altamente transferíveis (ÇİÇEK et. al., 2013), é possível que diferentes genes tenham sido adquiridos por estas cepas em diferentes períodos, e selecionados de acordo com a pressão exercida pelo uso de antimicrobianos em cada UTI (CHO et. al., 2009). Dados semelhantes foram previamente descritos por outros autores, que também não encontraram correlação entre cepas com alta similaridade genética e os genes de resistência (AGHAZADEH et. al., 2013; MAMMINA et. al., 2012).

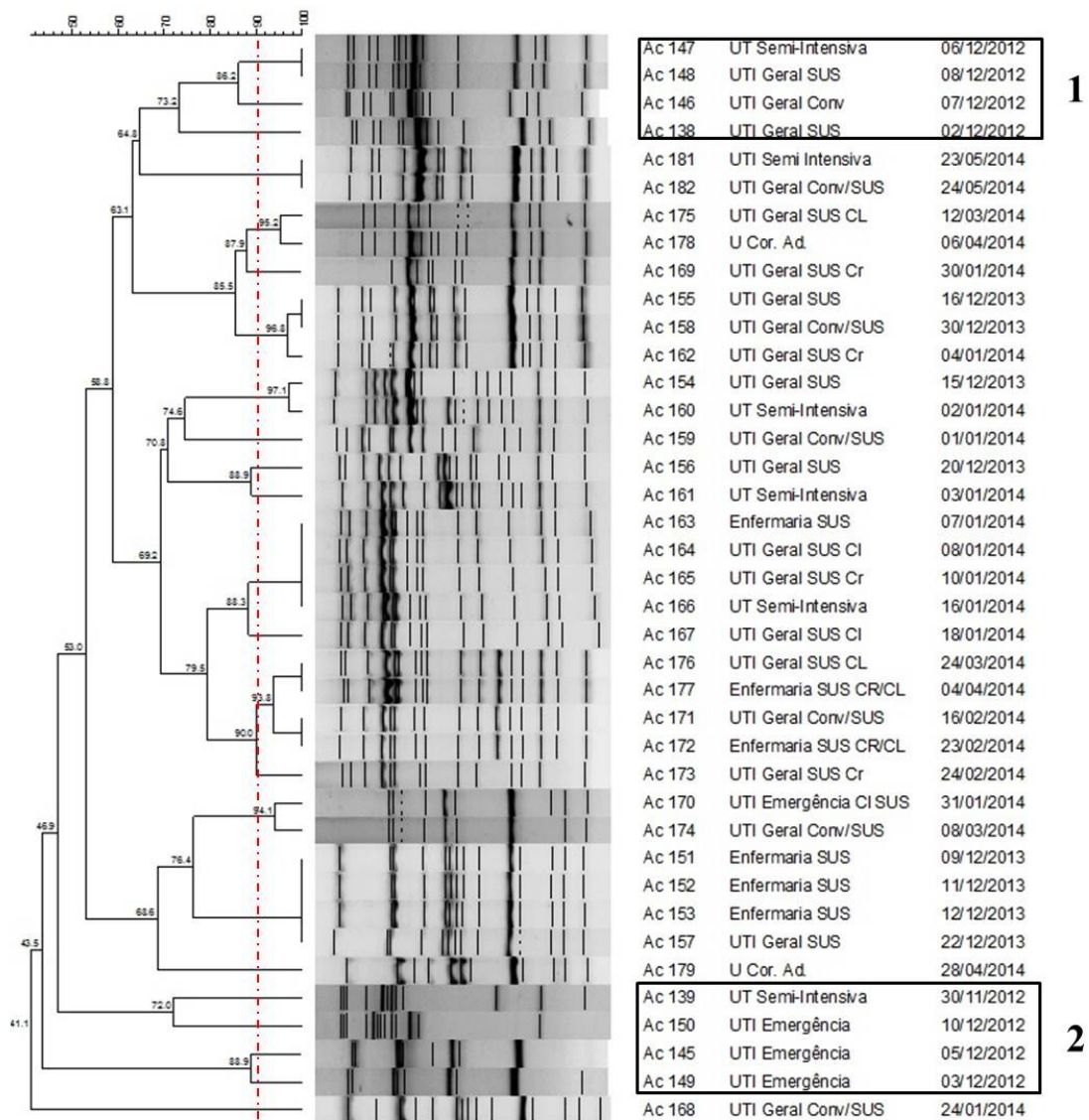
O presente estudo também mostrou a disseminação horizontal de genes de AMEs entre os clones de *A. baumannii* identificados no HB, pois estes genes estão distribuídos diferencialmente entre grupos genotipicamente distintos determinados por REP-PCR. Este fato já foi observado anteriormente no mesmo hospital (POLOTTO, 2014), e também foi relatado em outros estudos (AGHAZADEH et al., 2013; NIGRO; POST; HALL, 2011).

Além disso, é conhecido que a ocorrência de genes de AMEs, possivelmente codificadas por cassetes gênicos localizados em integrons de classe 1, onde genes de resistência a outras classes de antimicrobianos também são encontrados, constitui o mecanismo principal de resistência aos aminoglicosídeos (KARAH et al., 2011). Por isso, os dados representados no presente estudo demonstram que, juntamente com os genes de AMEs, outros genes de resistência a antimicrobianos podem estar disseminados nestes isolados, como genes de carbapenemases e β -lactamases. A presença destes outros genes e os mecanismos de disseminação requerem investigação posterior para melhor análise.

5.6.2 Comparação da Tipagem Molecular de *A. baumannii* em Isolados de 2012 e 2014

Os *A. baumannii* isolados no HB em 2014 foram comparados com isolados coletados em 2012, incluídos em estudo prévio (POLOTTO, 2014). A **Figura 12** mostra a comparação dos perfis de REP-PCR, incluindo os 31 isolados mais recentes e isolados de novembro/dezembro de 2012, do referido estudo anterior, em um mesmo dendrograma.

Figura 12 - Dendrograma com perfis de REP-PCR de 31 isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* de 2014 e 8 isolados de dezembro de 2012. [A linha vermelha traça o limite de similaridade ($\geq 90\%$), considerada para a formação de *clusters* no dendrograma.] **1** e **2**: agrupamentos de isolados de *A. baumannii* do ano 2012.



As cepas mais recentes não apresentaram similaridade genética ($\geq 90\%$) quando comparadas com as cepas de 2012, que foram separadas em dois grupos (1 e 2). No grupo 1, foram relacionadas quatro cepas de dezembro de 2012, que apresentaram 64,8% de similaridade genética com as cepas Ac 181 e Ac 182, de 2014. No grupo 2 estão três cepas isoladas em dezembro de 2012 e uma em novembro do mesmo ano. Neste grupo, as cepas geneticamente mais próximas das recentes são Ac 139 e Ac 150, com 53% de similaridade, sendo Ac 150 a última cepa isolada em 2012.

Considerando-se os grupos 1 e 2 e comparando estes com os mais recentes, é notável que o grupo 1 apresente maior similaridade genética com as cepas do atual estudo e, curiosamente, o último do estudo de 2012 (Ac 150) apresenta menor similaridade com os atuais. Entretanto, a última cepa de 2012 e a primeira de 2013 foram isoladas com cerca de um ano de diferença. Esse longo intervalo de tempo entre as coletas não possibilitou a visualização da continuidade das relações genéticas entre os isolados do estudo de 2012 e o atual.

Desse modo, a disseminação de *A. baumannii* no HB foi estudada em dois períodos distintos: 2012 e 2013-2014 (atual estudo). Diversas similaridades foram observadas, como a disseminação de *A. baumannii* em UTIs, transmissão horizontal, perfil geral de suscetibilidade aos antimicrobianos e genótipo de AMEs.

Algumas diferenças foram encontradas com relação ao estudo anterior, como aumento e diminuição das taxas de resistência aos antimicrobianos testados e detecção do gene *aac(3)-IIa*, não observado anteriormente. Isso evidencia a elevada capacidade de adaptação de *A. baumannii* e a necessidade de estudos posteriores objetivando o monitoramento da evolução das taxas de resistência aos antimicrobianos e da disseminação deste patógeno dentro do HB.

Como já observado anteriormente (POLOTTO, 2014), as evidências de disseminação horizontal de *A. baumannii* na instituição reforçam a necessidade de adoção de medidas de precaução apropriadas (PEYMANI et. al., 2012). Apesar do controle de infecções causadas por *A. baumannii* nos hospitais ser muito difícil, as medidas a serem tomadas consistem em desinfecção do ambiente em associação com programas educacionais que promovam a higienização das mãos de profissionais de saúde e isolamento de pacientes (URBAN et. al., 2003).

6. CONCLUSÕES

- Os isolados estudados apresentam altas taxas de resistência às cefalosporinas de terceira geração, carbapenêmicos, fluoroquinolonas e aos aminoglicosídeos, caracterizando-os como multirresistentes;
- Não há diferenças significativas entre as metodologias de disco-difusão e microdiluição para os aminoglicosídeos Amicacina e Gentamicina, mostrando que ambas metodologias podem ser utilizadas para verificação da suscetibilidade a estes antimicrobianos;
- Os *A. baumannii* incluídos neste estudo são carreadores dos genes de AMEs: *aph(3')-VI*, *aph(3')-Ia*, *aac(3)-Ia*, *aac(6')-Ib* e *aac(3)-IIa*;
- Há correspondência significativa entre os genes de AMEs *aac(6')-Ib* e o fenótipo de resistência a Amicacina/Tobramicina e para *aac(3)-Ia* e o fenótipo de resistência a Gentamicina, sugerindo que estes genes estão expressos nos isolados deste estudo;
- Vários clones de *A. baumannii* promovem infecções em pacientes do HB, como observado após a análise dos genótipos gerados pela tipagem molecular.
- A comparação entre o atual trabalho e o estudo anterior revela um aumento nas taxas de resistência à Amicacina, Gentamicina, Ampicilina/Sulbactam e Tigeciclina. As frequências de genótipos de AMEs permanecem semelhantes nos dois estudos e a disseminação horizontal de *A. baumannii* multirresistentes continua nas UTIs da instituição.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBO, A. et al. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Emerg Infect Dis.**, v. 11, n. 1, p. 22-9, Jan. 2005.

ADAMS-HADUCH, J. M. et al. Genetic Basis of Multidrug Resistance in *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates at a Tertiary Medical Center in Pennsylvania. **Antim Agents Chemoter.**, v. 52, n. 11, p. 3837-43, Nov. 2008.

AGHAZADEH, M. et al. Dissemination of Aminoglycoside-Modifying Enzymes and 16S rRNA Methylases Among *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* Isolates. **Microbial Drug Resistance.** v.19, n. 4, p. 282-28, Aug. 2013.

AKERS, K. S. et al. Aminoglycoside resistance and susceptibility testing errors in *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex. **J Clin Microbiol.**, v. 48, n. 4, p. 1132-1138, Apr. 2010.

ALMEIDA, L. A.; ARAUJO, R. Highlights on molecular identification of closely related species. **Infect Genet Evol.**, v. 13, p. 67-75, Jan. 2013.

AL MOHAJER M.; DAROUICHE R. O. Sepsis syndrome, bloodstream infections, and device-related infections. **Med Clin North Am.**, v. 96, n. 6, p.1203-23, Nov.2012.

ANDREWS, J.; WALKER, R.; KING, A. Evaluation of media available for testing the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* by BSAC methodology. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 50, n. 4, p. 479-86, Oct. 2002.

ARVANITI, K. et al. Catheter-related infections in ICU (CRI-ICU) Group. Comparison of Oligon catheters and chlorhexidine-impregnated sponges with standard multilumen central venous catheters for prevention of associated colonization and infections in intensive care unit patients: A multicenter, randomized, controlled study. **Crit Care Med.**, v. 40, n. 2, p.420-429, Feb. 2012.

ASADOLLAHI, P. et al. Antimicrobial resistance patterns and their encoding genes among *Acinetobacter baumannii* strains isolated from burned patients. **Burns**, v. 38, n. 8, p. 1198-203, Dec. 2012.

AVENT, M. L. et al. Current use of aminoglycosides: indications, pharmacokinetics and monitoring for toxicity. **Intern Med J.**, v. 41, n. 6, p. 441-449, June 2011.

AZUCENA, E.; MOBASHERY, S. Aminoglycoside-modifying enzymes: mechanisms of catalytic processes and inhibition. **Drug Resistance Updates**, v. 4, n. 2, p.106-117, Apr. 2001.

BASSETTI, M. et al. New antibiotics for bad bugs: where are we? **Ann Clin Microbiol Antimicrob**, v. 12, p.12-22, Aug. 2013.

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. 1520-41, May 1968.

BEEKMANN, S. E.; HENDERSON, D. K. Infections caused by percutaneous intravascular devices. In: Mandell, G.L.; Bennett, J.E.; Dolin, R. **Bennett's principles and practice of infectious diseases**, v. 2, 7th edition. Philadelphia, Elsevier, p. 3697-715, 2010.

BECKER, B.; COOPER, M. A. Aminoglycoside Antibiotics in the 21st Century. **ACS Chem. Biol.**, v. 8, n. 1, p.105–115, Jan. 2013.

BERNARDS, A. T. et al. Persistent *Acinetobacter baumannii*? Look Inside Your Medical Equipment. **Infect Control Hosp Epidemiol.**, v. 25, n. 11, p. 1002-4, Nov. 2004.

BORGES, L. G. A.; DALLA VECHIA, V.; CORÇÃO, G. Characterization and genetic diversity via REP-PCR of *Escherichia coli* isolates from polluted waters in southern Brazil. **FEMS Microbiol Ecol.**, v. 45, n. 2, p.173-80, July 2003.

BOWTON, D. L. et al. The impact of hospital-wide use of a tapered-cuff endotracheal tube on the incidence of ventilator-associated pneumonia. **Respir Care.**, v. 58, n. 10, p.1582-1587, Oct. 2013.

BOU, G. et al. PCR-based DNA fingerprinting (REP-PCR, AP-PCR) and pulsed-field gel electrophoresis characterization of a nosocomial outbreak caused by imipenem- and meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Clin Microbiol Infect.**, v. 6, n. 12, p 635-43, Dec. 2000.

BRISOU J.; PREVOT A. R. Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under *Acromobacter* group. **Ann Inst Pasteur**, v. 86, n. 6, p.722-8, June 1954.

BROSSARD, K.A.; CAMPAGNARI, A.A. The *Acinetobacter baumannii* Biofilm-Associated Protein Plays a Role in Adherence to Human Epithelial Cells Infect Immun. **Infect Immun**, v. 80, n. 1, p. 228–233, Jan. 2012.

BUENO, M. F. et al. Coproduction of 16S rRNA methyltransferase RmtD or RmtG with KPC-2 and CTX-M group extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 57, n. 5, p. 2397-400, May 2013.

CALDWELL, S. J; BERGHUIS, A. M. Small-angle x-ray scattering analysis of the bifunctional antibiotic resistance enzyme aminoglycoside (6') acetyltransferase-Ie aminoglycoside (2') phosphotransferase-Ia reveals a rigid solution structure. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 4, p. 1899 –1906, Apr. 2012.

CAMPOS, G. M. Estatística Prática para Docentes e Pós- Graduandos. Disponível em: <http://www.forp.usp.br/restauradora/gmc/gmc_livro/gmc_livro_cap19.html>. Acesso em 18 de dezembro de 2014.

CARRETTO, E. et al. Widespread carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* clones in Italian hospitals revealed by a multicenter study. **Infect Genet Evol**, v. 11, n. 6, p. 1319-1326, Aug. 2011.

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 Agents.**, v. 34, n. 1, p. 25-8, July 2009.

CASERTA, R. A. et al. A program for sustained improvement in preventing ventilator associated pneumonia in an intensive care setting. **BMC Infect Dis.**, v. 12, p. 234, Sept. 2012.

CHAARI, A. et al. *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia: epidemiology, clinical characteristics, and prognosis factors. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 12, p. e1225-8, Dec. 2013.

CHEN, T. L. et al. Comparison of one-tube multiplex PCR, automated ribotyping and intergenic spacer (ITS) sequencing for rapid identification of *Acinetobacter baumannii*. **Clin Microbiol Infect.**, v. 13, n. 8, p. 801-806, Aug. 2007.

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, n. 2, p.185-190, June 2009.

ÇİÇEK, A. C. et al. Detection of class 1 integron in *Acinetobacter baumannii* isolates collected from nine hospitals in Turkey. **Asian Pac J Trop Biomed.**, v. 3, n. 9, p. 743-747, Sept. 2013.

CLÍMACO, E. C. Análise molecular de mecanismos determinantes de resistência a antibióticos em *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. **Tese de Doutorado.** Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. 76f. 2011.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. **Twenty-third Information Supplement M100-S24.** v.34, n.1. Wayne, PA: *Clinical and Laboratory Standards Institute*. 2014.

COX, G.; WRIGHT, G. D. Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. **Int J Med Microbiol.**, v. 303, n. 6-7, p.287-292, Aug. 2013.

DALLA-COSTA, L. M. et al. Outbreak of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Producing the OXA-23 Enzyme in Curitiba, Brazil. **J Clin Microbiol.**, v. 41, n.7, p. 3403-3406, July 2003.

DAVIS, M. A. et al . Discovery of a gene conferring multiple-aminoglycoside resistance in *Escherichia coli*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 54, n. 6, p. 2666-9, June 2010.

DE FRANCESCO, M. A. et al. Prevalence of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in an Italian hospital. **J Infect Public Health.**, v. 6, n. 3, p. 179-85, June 2013.

DENT L. L. et al. Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*: a descriptive study in a city hospital. **BMC Infect Dis.**, v. 10, p. 1-7, July 2010.

DIJKSHOORN, L. et al. Prevalence of *Acinetobacter baumannii* and other *Acinetobacter* spp. in faecal samples from nonhospitalised individuals. **Clin Microbiol Infect**, v. 11, n. 4, p. 329–32, Apr. 2005.

DIJKSHOORN, L.; NEMEC, A.; SEIFERT, H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Nat Rev Microbiol.**, v. 5, n. 12, p. 939-51, Dec. 2007.

DOI, Y.; ARAKAWA, Y. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. **Clin Infect Dis**. V. 45, n. 1, p. 88-94, July 2007.

DOI, Y. et al. Coproduction of novel 16S rRNA methylase RmtD and metallo-beta-lactamase SPM-1 in a panresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Brazil. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 51, n. 3, p. 852-6, Mar. 2007.

DOI, Y. et al. Screening for *Acinetobacter baumannii* colonization by use of sponges. **J Clin Microbiol.**, v. 49, n. 1, p. 154-8, Jan. 2011.

DOI, Y. YOKOYAMA, K.; YAMANE, K. et al. Plasmid-mediated 16S rRNA methylase in *Serratia marcescens* conferring high-level resistance to aminoglycosides. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 48, n. 2, p. 491-6, Feb. 2004.

DONG, X. et al. In vitro activities of rifampin, colistin, sulbactam and tigecycline tested alone and in combination against extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **J Antibiot (Tokyo)**, v. 67, n. 9, p. 677-90, Sept. 2014.

DURANTE-MAGNONI, E.; ZARRILLI, R. Global spread of drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: molecular epidemiology and management of antimicrobial resistance. **Future Microbiol.**, v. 6, n. 4, p. 407-22, Apr. 2011.

DURMAZ, R. et al. The optimization of a rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for the typing of *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. **Jpn J Infect Dis.**, v. 62, n. 5, p. 372-377, Sept. 2009.

DZIDIC, S.; BEDEKOVIĆ, V. Horizontal gene transfer-emerging multidrug resistance in hospital bacteria. **Acta Pharmacol Sin**, v. 24, n. 6, p. 519-526, June 2003.

EBENEZER, K. et al. Ventilator-associated *Acinetobacter baumannii* Pneumonia. **Indian Pediatr.**, v. 48, n. 12, p. 964-6, Dec. 2011.

FERNÁNDEZ, L.; HANCOCK, R. E. Adaptive and Mutational Resistance: Role of Porins and Efflux Pumps in Drug Resistance. **Clin Microbiol Rev.**, v. 25, n. 4, p. 661-681, Oct. 2012.

FERREIRA, A. E. et al. Molecular characterization of clinical multiresistant isolates of *Acinetobacter* sp. from hospitals in Porto Alegre, State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v. 44, n. 6, p. 725-30, Nov-Dec. 2011.

FISHBAIN, J.; PELEG, A.Y. Treatment of *Acinetobacter* infections. **Clin Infect Dis.**, v. 51, n. 1, p. 79-84, July 2010.

FOURNIER, P. E.; RICHEL, H. The Epidemiology and Control of *Acinetobacter baumannii* in Health Care Facilities **Clin Infect Dis.**, v.42, p. 692–699, Mar. 2006.

GALES, A. C.; JONES, R. N.; SADER, H. S. Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54731 clinical isolates of Gram-negative bacilli: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2001-2004). **Clin Microbiol Infect.**, v. 12, p.315, Apr. 2006.

GALIMAND, M.; COURVALIN, P.; LAMBERT, T. Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in Enterobacteriaceae due to 16S rRNA methylation. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 47, n. 8, p. 2565-71, Aug. 2003.

GALIMAND, M.; COURVALIN, P.; LAMBERT, T. RmtF, a new member of the aminoglycoside resistance 16S rRNA N7 G1405 methyltransferase family. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 56, n. 7, p. 3960-2, July 2012.

GERNER-SMIDT, P.; TJERNBERG, I.; URSING, J. Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. **J Clin Microbiol.**, v. 29, n. 2, p. 277–282, Feb. 1991.

GIAMARELLOU, H.; ANTONIADOU, A.; KANELAKOPOULOU, K. *Acinetobacter baumannii*: a universal threat to public health? **Int J Antimicrob Agents.**, v. 32, n. 2, p. 106–119, Aug. 2008.

GILAD, J. et al. “All-in-one-plate” E-test and disk diffusion susceptibility cotesting for multiresistant *Acinetobacter baumannii*. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, v. 25, n. 12, p. 799-802, Dec. 2006.

GILAD, J.; SCHWARTZ, D. Need for verification of imipenem (IPM), meropenem (MER) and amikacin (AK) VITEK-2 susceptibility results for *Acinetobacter baumannii* (Ab)? **48th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Washington, DC, Abstract D-284, 2008.

GOGOU, V. et al. Evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages: a 10 year study in Greece (2000–09). **J Antimicrob Chemother.**, v. 66, n. 12, p. 2767-72, Dec. 2011.

HE, C. et al. Clonal characteristics of *Acinetobacter baumannii* isolated from cerebrospinal fluid in a west China hospital. **J Med Microbiol.**, v. 62 (Pt 10), p. 1631-3, Oct. 2013.

HIGGINS, P. G. et al. Molecular epidemiology of *Acinetobacter baumannii* bloodstream isolates obtained in the United States from 1995 to 2004 using rep-PCR and multilocus sequence typing. **J Clin Microbiol.**, v. 50, n. 11, p. 3493-500, Nov. 2012.

HOJABRI, Z. et al. Molecular epidemiology of *Acinetobacter baumannii* in Iran: endemic and epidemic spread of multiresistant isolates. **J Antimicrob Chemother.**, v. 69, n. 9, p. 2383-7, Sept. 2014.

HOWARD, A. et al. *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen. **Virulence**. 2012, v. 3, n. 3, p. 243-50, May 2012.

IKONOMIDIS, A. et al. Discordance of meropenem versus imipenem activity against *Acinetobacter baumannii*. **Int J Antimicrob Agents.**, v. 28, n. 4, p. 376-377, Oct. 2006.

JEAN, S. S. et. al. Carbapenem susceptibilities and non-susceptibility concordance to different carbapenems amongst clinically important Gram-negative bacteria isolated from intensive care units in Taiwan: Results from the Surveillance of Multicentre Antimicrobial Resistance in Taiwan (SMART) in 2009. **Int J of Antimicrob Agents** v. 41, n. 5, p.4 57-62, May 2013.

JUNG, S. et al. Brief Communication: False Susceptibility to Amikacin by VITEK 2 in *Acinetobacter baumannii* Harboring *armA*. **Annals of Clinical & Laboratory Science**, v. 40, n. 2, p. 167-71, 2010.

KARAGEORGOPOULOS, D. E.; FALAGAS, M. E. Current control and treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. **Lancet Infect Dis.**, v. 8, n. 12, p. 751-62, Dec. 2008.

KARAH, N. Identification, molecular epidemiology, and antibiotic resistance characterization of *Acinetobacter* spp. clinical isolates. **A dissertation for the degree of Philosophiae Doctor**. University Hospital of North Norway. 107f. 2011.

KHAN, F. Y.; ABUKHATTAB, M.; BAAGER, K. Nosocomial postneurosurgical *Acinetobacter baumannii* meningitis: a retrospective study of six cases admitted to Hamad General Hospital, Qatar. **J Hosp Infect.**, v. 80, n. 2, p. 176–9, Feb. 2012.

KIM, Y. et al. In vivo emergence of colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates of sequence type 357 during colistin treatment. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v. 79, n. 3, p. 362-6, July 2014.

KOURBETI, I. S. et al. Infections in traumatic brain injury patients. **Clin Microbiol Infect.**, v. 18, n. 4, p. 359-64, Apr. 2012.

LAMBERT, T. et al. Dissemination of amikacin resistance gene *aphA6* in *Acinetobacter* spp. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 34, n. 6, p.1244–1248, June 1990.

LEAN, S. S. et al. Prevalence and Genetic Characterization of Carbapenem- and Polymyxin-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolated from a Tertiary Hospital in Terengganu, Malaysia. **ISRN Microbiol.**, v. 2014, p. 1-9, Mar. 2014.

LEE, H. W. et al. Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 14, n. 1, p. 49–54, Jan. 2008.

LIM, Y.M.; SHIN, K.S.; KIM, J. Distinct antimicrobial resistance patterns and antimicrobial resistance harboring genes according to genomic species of *Acinetobacter* isolates. **J Clin Microbiol.**, v. 45, n. 3, p. 902-5, Mar. 2007.

LO-TEN-FOE, J. R. et al. Comparative Evaluation of the VITEK 2, Disk Diffusion, Etest, Broth Microdilution, and Agar Dilution Susceptibility Testing Methods for Colistin in

Clinical Isolates, Including Heteroresistant *Enterobacter cloacae* and *Acinetobacter baumannii* Strains. **Antim Agents Chemoter.**, v. 51, n. 10, p. 3726-30, Oct. 2007.

LÓPEZ-CORTÉS, L. E.; RODRIGUES BAÑO J. Monotherapy versus combination therapy for sepsis due to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: analysis of a multicentre prospective cohort. **J. Antimicrob. Chemother.**, p. 1-8, Aug. 2014.

LÓPEZ-ROJAS, R. et al. Colistin resistance in a clinical *Acinetobacter baumannii* strain appearing after colistin treatment: effect on virulence and bacterial fitness. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 57, n. 9, p. 4587-9, Sept. 2013.

MA, M. et al. Analysis of drug resistance of *Acinetobacter baumannii* and its related factors in ICU. **Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue.**, v. 25, n. 11, p. 686-9, Nov. 2013.

MAGIORAKOS, A. P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clin Microbiol Infect.**, v. 18, n. 3, p. 268-8, Mar. 2012.

MAGNET, S.; COURVALIN, P.; LAMBERT, T. Activation of the cryptic *aac(6')-Iy* aminoglycoside resistance gene of *Salmonella* by a chromosomal deletion generating a transcriptional fusion. **J.Bacteriol.**, v. 181, n. 21, p. 6650-5, Nov. 1999.

MAGNET, S.; COURVALIN, P.; LAMBERT, T. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 45, n. 12, p. 3375-3380, Dec. 2001.

MAMMINA, C. et al. Epidemiology and clonality of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from an intensive care unit in Palermo, Italy. **BMC Res Notes.**, v. 5, n. 365, p. 1-8, July 2012.

MANCHANDA, V.; SANCHAITA, S.; SINGH, N.P. Multidrug resistant *Acinetobacter*. **J Glob Infect Dis**, v. 2, n. 3, p. 291–304, Sept. 2010.

MARAGAKIS, L. L.; PERL, T. M. *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. **Clin Infect Dis.**, v. 46, n. 8, p. 1254-1263, Apr. 2008.

MARCHAIM, D. et al. Surveillance cultures and duration of carriage of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **J Clin Microbiol.**, v. 45, n. 5, p. 151-5, Feb. 2007.

MARRA, A. R. et al. The Brazilian SCOPE Study Group Nosocomial Bloodstream Infections in Brazilian Hospitals: Analysis of 2,563 Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study. **J Clin Microbiol.**, v. 49, n. 5, p.1866–1871, May 2011.

MARTINS, A. F. et al. High endemic levels of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* among hospitals in Southern Brazil. **Am J Infect Control.**, v. 40, n. 2, p. 108-12, Mar. 2012.

MATHAI, A. S. et al. *Acinetobacter* infections in a tertiary level intensive care unit in northern India: Epidemiology, clinical profiles and outcomes. **J. Infect. Public Health**, v. 5, n. 2, p. 145-152, Apr. 2012.

MISHRA, M. P.; DEBATA, N. K.; PADHY, R. N. Surveillance of multidrug resistant uropathogenic bacteria in hospitalized patients in Indian. **Asian Pac J Trop Biomed.**, 2013; v. 3, n. 4, p. 315-324, Apr. 2013.

MORTENSEN, B. L.; SCAAR, E. P. Host-microbe interactions that shape the pathogenesis of *Acinetobacter baumannii* infection. **Cellular Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 1336-1344, Sept. 2012.

MOISOIU, A. et al. Antibiotic resistance of *Acinetobacter baumannii* strains isolated from clinical specimens in the "Marius Nasta" Pneumology Institute, Bucharest. **Pneumologia**, v. 63, n. 2, p. 109-11, Apr-June 2014.

MOODLEY, V. M. et al. Evaluation of Five Susceptibility Test Methods for Detection of Tobramycin Resistance in a Cluster of Epidemiologically Related *Acinetobacter baumannii* Isolates. **J Clin Microbiol.**, v. 51, n. 8, p. 2535-40, Aug. 2013.

MOTTA, V.; WAGNER, M. B. Bioestatística. Caxias do Sul: Editora Educ. 2003. 201p.

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 (Pt 12), p. 1233-40, Dec. 2004.

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, n. 4, p. 393-404, May 2011.

NEMEC, A. et al. Genotypic and phenotypic similarity of multiresistant *Acinetobacter baumannii* isolates in the Czech Republic. **J Med Microbiol.**, v. 48, n. 3, p. 287-96, Mar. 1999.

NIGRO, S. J.; POST, V.; HALL, R. M. Aminoglycoside resistance in multiply antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii* belonging to global clone 2 from Australian hospitals. **J Antimicrob Chemother**, v. 66, n. 7, p. 1504-1509, July 2011.

NORSKOV-LAURITSEN, N. et al. Antimicrobial susceptibility of tigecycline and comparators against bacterial isolates collected as part of the TEST study in Europe (2004-2007). **Int J Antimicrob Agents**. v. 34, n. 2, p. 121-130, Aug. 2009.

O'HARA, J. A. et al. Novel 16S rRNA methyltransferase RmtH produced by *Klebsiella pneumoniae* associated with war-related trauma. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 57, n. 5, p. 2413-6, May 2013.

PAPP-WALLACE, K. M. et al. Carbapenems: past, present, and future. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 55, n.11, p.4943-60, Nov. 2011.

PATERSON, D. L. et al. Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended spectrum beta-lactamase production in *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bacteremia. **Clin Infect Dis**, v. 30, n. 3, p. 473-8, Mar. 2000.

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, July 2008.

PEYMANI, A. et al. Characterization and clonal dissemination of OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* in Tabriz, northwest Iran. **Int J Antimicrob Agents**, v. 39, n. 6, p. 526-528, June 2012.

PITOUT, J. D. D. et al. Metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a large tertiary centre in Kenya. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. 8, p. 755-759, Aug. 2008.

POLLOCK, H. M. et al. Effect of different lots of Mueller-Hinton agar on the interpretation of the gentamicin susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 14, n. 3, p. 360-7, Sept. 1978.

POLOTTO, M. Investigação de genes de resistência a carbapenêmicos e aminoglicosídeos e tipagem molecular de amostras de *Acinetobacter baumannii* isoladas de pacientes internados em unidades de terapia intensiva de um hospital terciário. **Tese de Doutorado**, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. 107f. 2014.

QUALE, J. et al. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* endemic in New York City. **Clin. Infect. Dis**, v. 37, n. 2, p. 214-220, July 2003.

RAHAL, J. J. et al. Class restriction of cephalosporin use to control total cephalosporin resistance in nosocomial *Klebsiella*. **J A M A**, v. 280, n. 14, p. 1233-7, Oct. 1998.

REGUERO, M. T. et al. Antibiotic resistance patterns of *Acinetobacter calcoaceticus*-*A. baumannii* complex species from Colombian hospital. **Enferm Infecc Microbiol Clin.**, v. 31, n. 3, p. 142-6, Mar. 2013.

RESENDE, M. M. et al. Epidemiology and outcomes of ventilator-associated pneumonia in northern Brazil: an analytical descriptive prospective cohort study. **BMC Infect Dis**. v. 5, n.13, p.119, Mar. 2013.

RICE, L. B. Successful interventions for gram-negative resistance to extended spectrum β -lactam antibiotics. **Pharmacotherapy**, v. 19, n. 8, p. 120S-128S, Aug. 1999.

RODRIGUES, P. M. et al. Ventilator-associated pneumonia: epidemiology and impact on the clinical evolution of ICU patients. **J Bras Pneumol.**, v. 35, n.11, p.1084-91, Nov. 2009.

SABAT, A. J. et al. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. **Euro Surveill**, v. 18, n. 4, Jan. 2013.

SADER, H. S.; FLAMM, R. K.; JONES, R. N. Tigecycline activity tested against antimicrobial resistant surveillance subsets of clinical bacteria collected worldwide (2011). **Diagn Microbiol Infect Dis.** v.76, n. 2, p.217-221, June 2013.

SAEED, S. et al. Interinstitutional and intrainstitutional transmission of a strain of *Acinetobacter baumannii* detected by molecular analysis: comparison of pulsed-field gel electrophoresis and repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Infect Control Hosp Epidemiol.**, v. 27, n. 9, p. 981-983, Sept. 2006.

SCOTT, P.; DEYE, G.; SRINIVASAN, A. An outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex infection in the US military health care system associated with military operations in Iraq. **Clin Infect Dis.** v. 44, n. 12, p. 1577-1584, June 2007.

SEIFERT, H. et al. Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. **J Clin Microbiol.**, v. 35, n. 11, p. 2819–25, Nov. 1997.

SEIFERT, H. et al. Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of pulsed-field gel electrophoresis generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. **J Clin Microbiol.**, v. 43, n. 9, p. 4328-35, Sept. 2005.

SHAH, P. M.; ISAACS, R. D. Ertapenem, the first of a new group of carbapenems. **J Antimicrob Chemother.** v. 52, n. 4, p. 538–542, Oct. 2003.

SHIN, J. A. et al. Clinical outcomes of tigecycline in the treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection. **Yonsei Med J.**, v. 53, n. 5, p. 974-84, Sept. 2012.

SIENIAWSKI, K. et al. *Acinetobacter baumannii* nosocomial infections. **Pol Przegl Chir.**, v. 85, n. 9, p. 483-90, Sept. 2013.

SILVA, G. J. et al. Identification of widespread, closely related *Acinetobacter baumannii* isolates in Portugal as a subgroup of European clone II. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 13, n. 2, p. 190–195, Feb. 2007.

SINGH, A. et al. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. **Clin Microbiol Rev.**, v. 19, n. 3, p. 512- 530, July 2006.

SOSTARICH, A. M. et al. Impact of multiresistance of Gram-negative bacteria in bloodstream infection on mortality rates and length of stay. **Infect**, v. 36, n. 1, p. 31-35, Feb. 2008.

SPILIOPOULOU, A. et al. In vitro activity of tigecycline and colistin against *A. baumannii* clinical bloodstream isolates during an 8-year period. **J Chemother.**, v. 0, n. 0, p. 1-6, May 2014.

SUNG, J. Y. et al. Antimicrobial Resistance Determinants in Imipenem-nonsusceptible *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* Complex Isolated in Daejeon, Korea . **Korean J Lab Med.**, v. 31, n. 4, p. 265-270, Out. 2011.

TADA, T. et al. Emergence of 16S rRNA methylase-producing *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in hospitals in Vietnam. **BMC Infect Dis.**, v. 13, n. 251, p. 1-6, May 2013.

TAKAGI, E. H. Epidemiology and outcomes of ventilator-associated pneumonia in northern Brazil: an analytical descriptive prospective cohort study. **Tese de Doutorado**, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. 92f. 2011.

TEJERINA, E. et al. Incidence, risk factors, and outcome of ventilator-associated pneumonia. **J Crit Care**, v. 21, n. 1, p. 56-65, Mar. 2006.

THOM, K.A. et al. Environmental contamination because of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* surrounding colonized or infected patients. **Am J Infect Control.**, v. 39, n. 9, p. 711-5, Nov. 2011.

TOGNIM, M. C. et al. Resistance trends of *Acinetobacter* spp. in Latin America and characterization of international dissemination of multi-drug resistant strains: five-year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Int J Infect Dis.**, v. 8, n. 5, p. 284-91, Sept. 2004.

TOLENTINO, F. M. Investigação de genes de resistência às quinolonas e aminoglicosídeos em *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemases do tipo KPC em hospitais do estado de São Paulo. **Trabalho de Qualificação**, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. 97f. 2014.

TOSIN, I.; SILBERT, S.; SADER, H.S. The use of molecular typing to evaluate the dissemination of antimicrobial resistance among gram-negative rods in Brazilian hospitals. **Braz J Infect Dis.**, v. 7, n. 6, p. 360-369, Dec. 2003.

TURTON, J. F. et al. A prevalent, multiresistant clone of *Acinetobacter baumannii* in Southeast England. **J. Hosp. Infect.**, v. 58, n. 3, p. 170–179, Nov. 2004.

URBAN, C. S. et al. Considerations in control and treatment of nosocomial infections due to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Clin Infect Dis.** v. 36, p. 1268–74, May 2003.

VAKULENKO, S. B.; MOBASHER, Y. S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. **Clin Microbiol Rev.**, v. 16, n. 3, p. 430–450, July 2003.

VAN DEN BROEK, P. J. et al. Endemic and Epidemic *Acinetobacter* Species in a University Hospital: an 8-Year Survey. **J Clin. Microbiol.**, v. 47, n. 11, p. 3593–3599, Nov. 2009.

VIANA, G. F. et al. Evolution of antimicrobial resistance of *Acinetobacter baumannii* in an university hospital. **Lett Appl Microbiol.**, v. 53, n. 3, p. 374-8, Sept. 2011.

VILA, J. et al. In Vitro Antimicrobial Production of Beta-Lactamases, Aminoglycoside-Modifying Enzymes, and Chloramphenicol Acetyltransferase by and Susceptibility of Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 37, n. 1, p.138-141, Jan. 1993.

VISCA, P.; SEIFERT, H.; TOWNER, K.J. *Acinetobacter* infection- an emerging threat to human health. **IUBMB Life**, v. 63, n. 12, p. 1048-54, Dec. 2011.

WACHINO, J; ARAKAWA, Y. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: an update. **Drug Resist Updat.**, v. 15, n. 3, p.133-48, June 2012.

WACHINO, J. et al. Novel plasmid-mediated 16S rRNA methylase, RmtC, found in a proteus mirabilis isolate demonstrating extraordinary high-level resistance against various aminoglycosides. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 50, n. 1, p. 178-84, Jan. 2006.

WACHINO, J. et al. Novel plasmid-mediated 16S rRNA m1A1408 methyltransferase, NpmA, found in a clinically isolated *Escherichia coli* strain resistant to structurally diverse aminoglycosides. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 51, n. 12, p. 4401-9, Dec. 2007.

WADL, M. et al. Increasing Occurrence of Multidrug-Resistance in *Acinetobacter baumannii* Isolates From Four German University Hospitals, 2002–2006. **Infection.**, v. 38, n. 1, p. 47-51, Feb. 2010.

WANG, H. et al. Molecular epidemiology of clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. from Chinese hospitals. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 51, n. 11, p. 4022-8, Nov. 2007.

WEN, J. T. et al. Multidrug-resistant genes of aminoglycoside- modifying enzymes and 16S rRNA methylases in *Acinetobacter baumannii* strains. **Genet Mol Res.**, v. 13, n. 2, p. 3842-9, May 2014.

WRIGHT, G. D.; THOMPSON, P. R. Aminoglycoside phosphotransferases: proteins, structure, and mechanism. **Front Biosci.**, v. 4, p. 9–21, Jan. 1999.

XU, J. et al Surveillance and correlation of antibiotic consumption and resistance of *Acinetobacter baumannii* complex in a Tertiary Care Hospital in Northeast China, 2003-2011. **Int J Environ Res Public Health.**, v. 10, n. 4, p. 1462-73, Apr. 2013.

YAHAV, D. et al. Efficacy and safety of tigecycline: a systematic review and meta-analysis. **J Antimicrob Chemother.**, v. 66, n. 9, p. 1963-71, Sept. 2011.

YAMANE, K. et al. 16S rRNA methylase-producing, gram negative pathogens, **Japan. Emerg Infect Dis.**, v. 13, n. 4, p. 642-6, Apr. 2007.

YOKOYAMA, K.; DOI, Y.; YAMANE, K. et al. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. **Lancet.**, v. 362, n. 9399, p. 1888-93, Dec. 2003.

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, Mar. 2004.

ZARRILLI, R. et al. Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. **Int J Antimicrob Agents**, v. 41, n.1, p. 11-19, Jan. 2013.

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, ____/____/____

Assinatura