



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

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

Milena Polotto

**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**

São José do Rio Preto
2014

Milena Polotto

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 apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor 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.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Mara Correa Lelles Nogueira

São José do Rio Preto
2014

Polotto, Milena.

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 / Milena Polotto. -- São José do Rio Preto, 2014

106 f. : il., tabs.

Orientador: Mara Correa Lelles Nogueira

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

1. Microbiologia. 2. Genética microbiana. 3. Infecções por *Acinetobacter*. 4. Resistência microbiana a medicamentos. 5. Tipagem molecular. 6. Antibióticos beta-lactâmicos. I. Nogueira, Mara Correa 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

Milena Polotto

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 apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Área de Concentração - Sistemas de Computação, 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 Correa Lelles Nogueira
FAMERP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof^a. Dr^a. Beatriz Meurer Moreira
UFRJ – Rio de Janeiro

Prof^a. Dr^a. Marina Baquerizo Martinez
USP – São Paulo

Prof^a. Dr^a. Suzana Margareth Ajeji Lobo
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
12 de fevereiro de 2014

DEDICATÓRIA

Aos meus pais João Carlos Polotto (in memorian) e Sonia Thereza

Puia Polotto

AGRADECIMENTOS

À querida Prof^a. Dr^a Mara Correa Lelles Nogueira pela orientação, ensinamentos e confiança. Muito obrigada não apenas pela parte profissional, mas também pela amizade.

Ao Prof. Dr. Mauricio Lacerda Nogueira pelo conhecimento compartilhado e por conceder-me um espaço no Laboratório de Pesquisa em Virologia para a realização deste trabalho.

Aos funcionários do laboratório de Microbiologia do Hospital de Base, Dr^a Maria Gabriela de Lucca, Lucy, José Carlos, Adenice, Débora, Rogéria, Dionízia, Rosa, Paulo, Raphael e Rosana, pelo auxílio na coleta dos isolados e à CCIH, pela transmissão de informações importantes para a escrita deste trabalho.

Aos meus pais que sempre me apoiaram e incentivaram nos estudos e em todas as etapas de minha vida.

Ao Rafael Santi, pelo amor, compreensão e paciência, fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Ao Tiago Casella pela amizade, discussões de experimentos, conselhos e contribuição neste trabalho.

Aos meus amigos do laboratório de Microbiologia da FAMERP Fernanda, Simone, Lucely, Luana, Evelin e Mayra pelo auxílio, companheirismo e amizade.

Aos Professores e à Coordenação do Curso de Pós Graduação em Microbiologia da UNESP por contribuírem para o enriquecimento de meu conhecimento.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Eletroforese em gel de agarose mostrando o produto de amplificação dos genes da região ITS específica da espécie <i>A. baumannii</i> e da região do gene <i>recA</i> presente em todo o gênero <i>Acinetobacter</i> spp.....	50
Figura 2.	Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos em <i>Acinetobacter baumannii</i>	51
Figura 3.	Distribuição das cem amostras clínicas obtidas de <i>A. baumannii</i> por espécime clínico.....	53
Figura 4.	Distribuição dos cem pacientes presentes no estudo nas diferentes UTIs do HB.....	55
Figura 5.	Eletroforese em gel de agarose mostrando o produto de amplificação dos genes <i>bla</i> _{OXA-51like} e <i>bla</i> _{OXA-23like}	56
Figura 6.	Eletroforese em gel de agarose mostrando o produto de amplificação da PCR de ISAbal-F e OXA-23 like-R.....	57
Figura 7.	Porcentagem de isolados carreadores de genes de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos dos tipos <i>aph(3')-Ia</i> , <i>aac(3)-Ia</i> , <i>aac(6')-Ib</i> e <i>aph(3')-VI</i>	58
Figura 8.	Eletroforese em gel de agarose mostrando os produto de amplificação dos genes de EMAs.....	59
Figura 9.	Dendrograma de similaridade gerado pelo software Bionumerics ilustrando a relação epidemiológica entre os isolados	66
Figura 10.	Dendrograma mostrando o grupo A e seus quatro <i>clusters</i> A1, A2, A3 e A4	68

Figura 11.	Dendrograma mostrando o grupo B e seus três <i>clusters</i> B1, B2 e B3.....	70
Figura 12.	Dendrograma mostrando o grupo C e seus cinco <i>clusters</i> C1, C2, C3, C4 e C5.....	72
Figura 13.	Dendrograma mostrando o grupo D e seus seis <i>clusters</i> D1, D2, D3, D4, D5 e D6	73
Figura 14.	Dendrograma mostrando o grupo E e seus dois <i>clusters</i> E1 e E2	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Padrões de Interpretação de valores de halo e CIM para <i>Acinetobacter</i> spp. segundo CLSI.....	38
Tabela 2.	Protocolo da Duplex-PCR realizada para a identificação de <i>Acinetobacter baumannii</i>	41
Tabela 3.	<i>Primers</i> utilizados para a identificação de <i>A. baumannii</i> , para investigação de genes de carbapenemases e para a tipagem molecular por REP-PCR.....	42
Tabela 4.	Protocolo de Multiplex-PCR para detecção de carbapenemases do tipo OXA.....	45
Tabela 5.	Protocolo de PCR para detecção de carbapenemases das classes A, B e D.....	43
Tabela 6.	Protocolo das reações triplex 1 e triplex 2 para aminoglicosídeos.....	44
Tabela 7.	Reação de PCR-Duplex para detecção de EMAs.....	45
Tabela 8.	<i>Primers</i> utilizados nas reações de PCR para a investigação de genes de resistência aos aminoglicosídeos.....	46
Tabela 9.	Protocolo REP-PCR utilizado no estudo.....	47
Tabela 10.	Distribuição de genes de resistência aos aminoglicosídeos e seus respectivos fenótipos de susceptibilidade.....	60-62
Tabela 11.	Frequência de genótipos de EMAs, sua especificidade de substratos e fenótipos de susceptibilidade aos aminoglicosídeos dos <i>A. baumannii</i> estudados.....	63

Tabela 12.	Distribuição de <i>A. baumannii</i> do grupo A nas UTIs com respectivas datas de isolamento, genótipo e <i>clusters</i> a que pertencem.....	68
Tabela 13.	Distribuição de <i>A. baumannii</i> do grupo A nas UTIs com respectivas datas de isolamento, genótipo e <i>clusters</i> a que pertencem.....	71
Tabela 14.	Distribuição de <i>A. baumannii</i> do grupo C nas UTIs com respectivas datas de isolamento, genótipo e <i>clusters</i> a que pertencem.....	72
Tabela 15.	Distribuição de <i>A. baumannii</i> do grupo D nas UTIs com respectivas datas de isolamento, genótipo e <i>clusters</i> a que pertencem.....	75
Tabela 16.	Distribuição de <i>A. baumannii</i> do grupo E nas UTIs com respectivas datas de isolamento, genótipo e <i>clusters</i> a que pertencem.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- °C – Graus Celsius
- µg – Micrograma
- µL – Microlitro
- µM – Micromolar
- g – giros
- Kb – Quilobases
- mL – Mililitro
- mg - miligrama
- Mg²⁺: Magnésio
- MgCl₂ – Cloreto de Magnésio
- NaCl – Cloreto de Sódio
- gen.sp. - genoespécie
- pb - Pares de bases
- pH - Potencial hidrogeniônico
- pmol – Picomol
- V/cm – Volts por centímetro
- AACs – Acetiltransferases
- AcCoA - Acetil-coenzima A
- ADC – “*Acinetobacter derived cephalosporinases*”
- ADP – Adenosina Difosfato
- AFLP – “Amplified Fragment Length Polymorphism”
- AIM - “Australian Imipenemase”
- ANTs – Nucleotidiltransferases
- APHs – Fosfotransferases
- ARDRA – “Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis”
- ARI – “*Acinetobacter Resistant imipenem*”
- ATCC - “American Type Culture Collection”
- ATP – Adenosina Trifosfato
- AK – Amicacina
- CAZ – Ceftazidima
- CDC – “Centers for Disease Control and Prevention”
- CIM - Concentração Inibitória Mínima

CIP - Ciprofloxacina
CLSI - “Clinical and Laboratory Standards Institute”
CHDL - “Carbapenem Hydrolysing class D enzymes”
CN - Gentamicina
CoASH - Coenzima A
CTX - Cefotaxima
DIM - “Dustch Imipenemase”
DNA - Ácido desoxirribonucléico
DRS - Divisão Regional de Saúde
dNTP - Deoxynucleosidetriphosphate
EDTA - Ácido etileno-diamino tetracético
ERIC-PCR - “Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR”
ESBL - “Extended-spectrum beta-lactamase”
ECDC - “European Centre for Disease Prevention and Control”
EDTA - Ácido etileno-diamino tetracético
EMAs - Enzimas Modificadoras de Aminoglicosídeos
EUA - Estados Unidos da América
EUCAST - “European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing”
FAMERP - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
FEP - Cefepime
GES - “Guiana extended-spectrum serine beta-lactamase”
GTP - Guanosina Trifosfato
GDP - Guanosina Difosfato
HB - Hospital de Base
I - Intermediário
IMP - Imipenemase
Int - Integron
IPM - Imipenem
IRAS - Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
IRs - Invertidas Repetidas
IS - Sequência de Inserção
KHM - “Kyorin University Hospital imipenemase”
KPC - “Klebsiella pneumoniae carbapenemase”
LBA - Lavado-broncoalveolar

LPS - Lipopolissacarídeo
MBLs - Metallo-beta-lactamases
MDR - Multirresistentes
MLST - “Multilocus Sequencing Typing”
MEM - Meropenem
NDM - Nova Deli Imipenemase
NNIS - “National Nosocomial Infections Surveillance”
PAV - Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica
PCR - “Polymerase chain reaction”
PFGE - “Pulsed Field Gel Electrophoresis”
OXA - Oxacilinase
PDR - panresistente
R - Resistente
RAPD - “Random Amplification of Polymorphic DNA ”
REP - “Repetitive Extragenic Palindromic”
RFLP - “Restriction fragment length polymorphisms”
RNAm - Ácido ribonucléico mensageiro
RNAt - Ácido ribonucléico transportador
S - Sensível
SCOPE - Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiological Importance
SENTRY - “Antimicrobial Surveillance Program”
SPM - São Paulo Metallo-Beta-Lactamase
SIM - Seul Imipenemase
TBE - Tris, EDTA, Ácido bórico
TE - Tris EDTA
TMB - Tripoli Metallo Beta-Lactamase
TNs - Transposon
Tris - Hidroximetilaminometano
TSA - Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos
TSB - “Tryptic Soy Broth”
TZP - Piperacilina Tazobactam
UTI - Unidade de Terapia Intensiva
VIM - Verona Imipenemase
XDR - Extensivamente Resistente

RESUMO

O gênero *Acinetobacter* compreende bacilos Gram-negativos ubíquos na natureza e suas principais espécies, *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. pittii* e *A. nosocomialis*, foram agrupadas no complexo *Acinetobacter baumannii-Acinetobacter calcoaceticus* (complexo ACB) por apresentarem alta similaridade genética e por serem de difícil diferenciação por métodos bioquímicos. As infecções mais causadas pelo complexo ACB são pneumonias e bacteremias e, para o tratamento destas, são muito utilizados os beta-lactâmicos, aminoglicosídeos e polimixinas. Entretanto, a resistência aos beta-lactâmicos e aminoglicosídeos tem aumentado em *Acinetobacter* spp., principalmente, devido à produção de enzimas chamadas beta-lactamases e enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EMAs). Neste contexto, os objetivos do estudo foram avaliar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, investigar genes de carbapenemases (*bla*_{OXA-23like}, *bla*_{OXA-51like}, *bla*_{OXA-58like}, *bla*_{OXA24-40like}, *bla*_{OXA-143like}, *bla*_{OXA-48like}, *bla*_{KPC}, *bla*_{GES}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} e *bla*_{SPM}), e de EMAs [*aac*(3)-Ia, *aac*(3')-II, *aaac*(6')-Ih, *aph*(3')-VI, *ant*(2')-Ia, *aph*(3')-Ia e *aac*(6')-Ib] por PCR e determinar a similaridade genética dos isolados de *A. baumannii* por REP-PCR. Cem isolados do complexo ACB resistentes aos carbapenêmicos provenientes de pacientes admitidos em unidades de terapia intensiva (UTIs) do Hospital de Base de São José do Rio Preto (HB) foram encaminhados ao laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), onde foram realizadas a extração de DNA, a identificação da espécie, a investigação dos genes e a tipagem molecular por REP-PCR. Todos os isolados apresentaram fenótipo de multirresistência e foram identificados como pertencentes à espécie *A. baumannii*. Os genes *bla*_{OXA-23like} e *bla*_{OXA-51like} foram detectados em 100% dos isolados, e, em todos, *ISAbal* estava localizado “upstream” ao gene *bla*_{OXA-23like}. Os genes de EMAs detectados foram *aph*(3')-VI (55%), *aac*(6')-Ib (46%), *aac*(3)-Ia (30%) e *aph*(3')-Ia (24%). A tipagem por REP-PCR gerou cinco grupos (A, B, C, D e E), formando 20 clusters. Desses, vários foram *clusters* endêmicos, isolados durante todo o período de coleta e em todas as UTIs do HB. Além disso, a ocorrência de transmissão horizontal de isolados do mesmo *cluster* entre diferentes pacientes também foi observada.

Palavras-Chave: *Acinetobacter baumannii*. Resistência. Beta-lactâmicos. Aminoglicosídeos. Tipagem Molecular.

ABSTRACT

The *Acinetobacter* genus comprises ubiquitous Gram-negative bacilli and its main species, *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. pittii* and *A. nosocomialis* were grouped in the the *Acinetobacter baumannii* - *Acinetobacter calcoaceticus* Complex (ACB Complex) due to their high genetic similarity and for their difficult differentiation by biochemical methods. Most infections caused by ACB complex are pneumonia and bacteremias, and, to treat these, beta-lactams, aminoglycosides and polymyxins are widely used. Nevertheless, beta-lactams and aminoglycosides resistance has been increasing in *Acinetobacter* spp., mainly, due to the enzymes production called beta-lactamases and aminoglycosides modifying enzymes (AMEs). Thus, the study objectives were to evaluate the antimicrobial susceptibility profile, investigate the carbapenemases gene (*bla*_{OXA-23like}, *bla*_{OXA-51like}, *bla*_{OXA-58like}, *bla*_{OXA24-40like}, *bla*_{OXA-143like}, *bla*_{OXA-48like}, *bla*_{KPC}, *bla*_{GES}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} and *bla*_{SPM}), the AMEs genes [*aac*(3)-Ia, *aac*(3)-II, *aac*(6')-Ih, *aph*(3')-VI, *ant*(2')-Ia, *aph*(3')-Ia and *aac*(6')-Ib], and to determine the genetic similarity by REP-PCR. One hundred carbapenem resistant isolates of ACB complex were sent to the Microbiology Laboratory of the Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, where DNA extraction, species identification, PCRs and molecular typing by REP-PCR were carried out. All of the isolates showed multidrug resistance phenotype and were identified as *A. baumannii*. The genes *bla*_{OXA-23like} and *bla*_{OXA-51like} were present in 100% of the isolates and *ISAbal* was “upstream” to the *bla*_{OXA-23like} gene. The AMES genes detected were *aph*(3')-VI (55%), *aac*(6')-Ib (46%), *aac*(3)-Ia (30%) and *aph*(3')-Ia (24%). The REP-PCR typing generated five groups (A, B, C, D and E) with 20 clusters. Of these, many were endemic clusters, because they were isolated during all the collection period and in all the HB's ICUs. Furthermore, the horizontal transmission among patients could be observed.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*. Resistance. Beta-lactams. Aminoglycosides. Molecular Typing.

Sumário

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 O gênero <i>Acinetobacter</i> e suas espécies	18
2.2 <i>Acinetobacter baumannii</i> e as infecções relacionadas à assistência à saúde	20
2.3 Antimicrobianos utilizados no tratamento de <i>A. baumannii</i>	22
2.3.1 Beta-lactâmicos	22
2.3.2 Aminoglicosídeos	23
2.3.3 Quinolonas, Polimixinas e Tigeciclina	24
2.4 Resistência a antimicrobianos em <i>Acinetobacter baumannii</i>	24
2.4.1 Resistência aos beta-lactâmicos	25
2.6 Resistência aos aminoglicosídeos em <i>Acinetobacter</i>	30
2.6.1 Acetiltransferases (AACs)	31
2.6.2 Fosfotransferases (APHs)	31
2.6.3 Nucleotiltransferases (ANTs)	32
2.7 Tipagem molecular	32
3. OBJETIVOS	35
3.1. Objetivo geral	35
3.2 Objetivos específicos	35
4. MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 Seleção dos Isolados	37
4.2 Identificação e determinação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos	37
4.3 Armazenamento e manutenção dos isolados	38
4.4 Extração de DNA genômico bacteriano	39
4.5 Identificação das espécies de <i>Acinetobacter baumannii</i> através de Duplex-PCR	40
4.6 Investigação de genes de resistência por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	42
4.6.1 Genes de carbapenemases da classe D (Multiplex-PCR)	42
4.6.2 Genes de carbapenemases das Classes A, B e D	43
4.6.3 Investigação da Associação da Sequência de Inserção <i>ISAbal</i> e de <i>bla_{OXA-23}like</i> e à <i>bla_{OXA-51}like</i>	43
4.6.4 Investigação de genes de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos	44
4.7 Purificação dos produtos de PCR para sequenciamento	46
4.8 Sequenciamento dos genes	46
4.9 Tipagem molecular dos isolados de <i>A. baumannii</i> pelo método de REP-PCR	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1 Identificação de <i>Acinetobacter baumannii</i>	50
5.2 Determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos	50
5.3 Perfil clínico-epidemiológico	53
5.4 Investigação de genes de carbapenemases	55
5.6 Investigação de genes de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos	58
5.7 Tipagem molecular de <i>A. baumannii</i>	65
6. CONCLUSÕES	78
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
ANEXO	102

Introdução e Justificativa

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O Hospital de Base da Fundação Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (HB) é um importante hospital-escola de nível terciário do Estado de São Paulo. Encontra-se vinculado à Faculdade de Medicina de Rio Preto (FAMERP), e 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). Possui 720 leitos distribuídos entre alas clínicas, cirúrgicas e unidades de terapia intensiva (UTIs). No HB 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 AIDS 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.

Devido à sua complexidade da instituição e à gravidade dos quadros clínicos dos pacientes atendidos, são observadas no HB altas taxas de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), causadas por uma diversidade de patógenos Gram-positivos e Gram-negativos resistentes a várias classes de antimicrobianos. Entre estes, *Acinetobacter baumannii* multirresistentes tem-se destacado tanto pela crescente prevalência, principalmente nas unidades de terapia intensiva, onde promovem infecções de difícil tratamento em pacientes propensos devido à imunossupressão, internação e antibioticoterapia prolongados, rompimento de barreiras físicas ou doenças de base. Somente no período deste estudo, foram isolados no HB 454 *Acinetobacter* spp, sendo 406 resistentes aos carbapenêmicos e 308 de pacientes admitidos em diferentes UTIs.

As infecções por *A. baumannii* multirresistentes resultam em alta mortalidade, e por isso, este patógeno têm sido alvo de amplos estudos visando o conhecimento de fatores clínicos e epidemiológicos associados, e também a identificação dos determinantes genéticos da resistência. Estas informações são úteis para a elaboração dos programas de prevenção e controle das infecções, e quando usadas de forma sistematizada, podem colaborar para a redução das taxas de infecção e da mortalidade associada.

Revisão Bibliográfica

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O gênero *Acinetobacter* e suas espécies

O gênero *Acinetobacter* compreende bactérias Gram-negativas, não-fermentadoras da glicose, aeróbias estritas, imóveis, não fastidiosas, catalase positivas e oxidase negativas, com dimensões que variam entre 1-1,5 µm de diâmetro e 1,5-2,5 µm de comprimento (FOURNIER e RICHET, 2006; PELEG et. al., 2008; GIAMARELLOU et. al., 2008). Organizam-se em pares e apresentam-se como bacilos durante a fase exponencial de crescimento e cocobacilos durante a fase estacionária, e, geralmente, possuem uma cápsula polissacarídica (BERGOGNE-BEREZIN e TOWNER, 1996; OLIVEIRA, 2007; PELEG et. al., 2008). Bactérias do gênero *Acinetobacter* são ubíquas na natureza, e podem ser isoladas do solo, da água, de plantas, animais e seres humanos (HOWARD et.al., 2012).

Esse gênero foi inicialmente descrito em 1911, quando o microbiologista holandês Martinus Willenm Beijerinck isolou do solo, em um meio de cultura enriquecido com acetato de cálcio, uma bactéria que denominou *Micrococcus calcoaceticus* (BAUMANN et. al., 1968). Nas décadas seguintes, organismos semelhantes foram descritos e atribuídos a pelo menos 15 gêneros e espécies diferentes, incluindo *Diplococcus mucosus*, *Micrococcus calcoaceticus*, *Alcaligenes haemolysans*, *Mima polymorpha*, *Moraxella lwoffii*, *Herellea vaginocola*, *Bacterium anitratum*, *Neisseria winogradskyi*, *Achromobacter anitratum* e *Achromobacter mucosus* (PELEG et. al., 2008).

Apenas após 43 anos, Brisou e Prevot (1954) instituíram a nomenclatura *Acinetobacter* (do grego “akinetos” que significa não-móvel), com o intuito de diferenciá-los do gênero *Achromobacter*, formado por micro-organismos móveis. 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) que também incluía neste mesmo gênero o *Micrococcus calcoaceticus*, *Alcaligenes hemolysans*, *Mima polymorpha*, *Moraxella lwoffii*, *Herellea vaginicola* e *Bacterium anitratum*. Finalmente, o gênero *Acinetobacter*, inicialmente classificado na família *Neisseriaceae*, foi inserido na família *Moraxellaceae* com a atual classificação taxonômica: Domínio Bacteria; Filo Proteobacteria; Classe Gammaproteobacteria; Ordem Pseudomonadales; Família *Moraxellaceae*; Gênero *Acinetobacter* (www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy acesso em 10/01/2014) (BERGOGNE-BEREZIN e TOWNER, 1996).

Atualmente, existem 32 espécies de *Acinetobacter* descritas (<http://www.bacterio.cict.fr/a/acinetobacter.html>- acesso em 10/01/2014). A diferenciação entre algumas espécies é considerada uma tarefa complexa, principalmente em laboratórios clínicos de rotina, onde são empregados métodos convencionais baseados em características fenotípicas (BOUVET e GRIMONT, 1986; GERNER-SMIDT, et. al., 1991; SCHRECKENBERGER et. al., 2003; DIJKSHOORN et. al., 2007). O primeiro esquema para a identificação das espécies de *Acinetobacter* foi proposto por Bouvet e Grimont em 1986 e consiste na utilização de 28 testes fenotípicos. Este sistema foi considerado eficiente para a diferenciação da maioria das espécies, com exceção 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). Entretanto, por não diferenciar as espécies mais importantes como agentes de infecção em humanos, (*A. baumannii*, *A. pittii* e *A. nosocomialis*) este sistema de identificação tem sido considerado inadequado (DIJKSHOORN et. al., 2007).

Em 1991, as espécies *A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis* e *A. calcoaceticus*, foram agrupadas em um complexo denominado *Acinetobacter baumannii* - *Acinetobacter calcoaceticus* (complexo ACB) por apresentarem alta similaridade genética (GERNER-SMIDT et. al., 1991). A identificação fenotípica do complexo ACB pode ser realizada com base em testes que identificam diferentes características fisiológicas e metabólicas, como a capacidade de crescimento a 44 °C, oxidação da glicose, hidrólise da gelatina e assimilação de diferentes fontes de carbono. Diversas plataformas comerciais, usadas em laboratórios clínicos para a identificação de patógenos, contêm estes testes, entretanto, são consideradas de baixa acurácia (BOO et. al., 2009).

Por esta razão, na última década foram desenvolvidos métodos baseados na diferenciação de características genéticas para a identificação das espécies do complexo ACB. Entre eles, destacam-se o AFLP (polimorfismo do fragmento amplificado), o ARDRA (análise da restrição do fragmento do gene 16S do RNAr amplificado), o sequenciamento do gene *rpoB* e suas regiões flangeadoras (JANSSEN et. al., 1997; DIJKSHOORN et. al., 1998; SCOLA et. al., 2006) e o esquema baseado no sequenciamento de sete genes conservados em *A. baumannii* (*gltA*, *gyrB*, *gdhB*, *recA*, *cpn60*, *gpi*, *rpoD*), denominado “*Multilocus Sequencing Typing*” (BARTUAL et. al., 2005; ALMEIDA e ARAÚJO, 2013). Apesar de sua precisão, a inclusão destas técnicas na rotina de um laboratório clínico ainda não é uma realidade, devido à sua complexidade e alto custo (KARAH, 2011; CHAN et. al., 2012). Em 2007, Chen e colaboradores descreveram um método baseado na detecção por reação da

polimerase em cadeia (PCR), de um fragmento de 208 pares de bases correspondente à uma região intergênica específica da subunidade 16S do RNA ribossômico da espécie *A. baumannii*. Este método, mais rápido que os demais baseados em biologia molecular, apresenta menor custo, mas seu uso é limitado por permitir apenas a identificação de *A. baumannii*.

A necessidade de identificação de *Acinetobacter* spp. em laboratórios de rotina tem sido questionada, já que o tratamento é primeiramente determinado pelo perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos, não pela espécie a que pertence (PELEG et. al.; 2008; VAN DEN BROEK et. al., 2009). Entretanto, para o controle de surtos de infecção, a distinção entre espécies é indispensável, pois as medidas de controle diferem dependendo das características de cada espécie. Além disso, a identificação de espécies de *Acinetobacter* é essencial para aprimorar o conhecimento sobre a epidemiologia, patogenicidade e impacto clínico das diferentes espécies do gênero (GERNER-SMIDT et.al., 1991; VAN DEN BROEK et. al., 2009).

A atual revisão bibliográfica teve como foco principal *A. baumannii*, espécie que tem emergido como um dos principais patógenos oportunistas em instituições de assistência à saúde mundialmente, e que possui grande habilidade em adquirir determinantes de resistência (PELEG et. al. 2008; DIANCOURT et. al., 2010).

2.2 *Acinetobacter baumannii* e as infecções relacionadas à assistência à saúde

Durante as três últimas décadas, *A. baumannii* tornou-se um patógeno oportunista de grande importância (MARTINS, A. et. al., 2013), comumente associado à pneumonias, bacteremias, meningites, infecções do trato urinário e de ferida operatória (GARNACHO-MONTERO et. al., 2010; MANCHANDA et. al., 2010; ANTUNES et. al., 2013).

Pacientes com predisposição às infecções por *A. baumannii* são os politraumatizados, queimados e que realizaram cirurgias de grande porte; pacientes que foram submetidos à antibioticoterapia prévia ou estadia prolongada em unidades de terapia intensiva com tubos de drenagem e cateteres e os submetidos à ventilação mecânica (FOURNIER e RICHET, 2006; HARTZELL et. al., 2007). Além disso, na última década, tem sido identificado com crescente frequência como agente de pneumonias comunitárias em regiões próximas ao oceano Índico, infecções em soldados feridos em batalhas no Iraque e Afeganistão e infecções em vítimas de desastres naturais (EVEILLARD e JOLY-GUILLOU, 2012).

A. baumannii 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 (LEE et. al., 2008; BROSSARD e CAMPAGNARI, 2012; ZARRILLI et. al., 2013). Por sobreviver por longos períodos em superfícies abióticas, tais como equipamentos médicos, macas, cateteres e equipamentos de ventilação mecânica (MCCONNELL et. al., 2012; FIESTER e ACTIS, 2013), *A. baumannii* é facilmente transmitido entre pacientes, o que favorece a ocorrência de surtos de infecções (GADDY e ACTIS, 2011; HOWARD et. al., 2012).

A. baumannii é um importante e frequente agente etiológico de pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) (CARNEIRO et. al., 2010), 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%, sendo esta devida a diferentes critérios de diagnóstico de pneumonia e diferenças na população de pacientes (TEJERINA et. al., 2006; BOWTON et. al., 2013). Os fatores de risco para a PAV por *A. baumannii* são longo tempo de internação, ventilação mecânica por tempo prolongado, aspiração de secreção orofaríngea colonizada, sepse, realização de neurocirurgia, reintubação e utilização prévia de antimicrobianos. As taxas de mortalidade associadas variam de 30-75%, sendo as maiores reportadas entre pacientes sob ventilação mecânica (LUNA e ARUKI, 2007; CAPELLIER et. al., 2013).

As infecções da corrente sanguínea ocorrem quando há isolamento de um ou mais micro-organismos após 24 horas de admissão hospitalar na presença de sintomas de infecção (AL MOHAJER e DAROUICHE, 2012). 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 (BEEKMANN e HENDERSON, 2010; AL MOHAJER e DAROUICHE, 2012).

As infecções de pele ou tecidos moles causadas são muito comuns em unidades de queimados e em feridas de soldados de guerra, sendo *A. baumannii*, o micro-organismo mais isolado em um acampamento de vítimas de guerra com fraturas expostas da tíbia no Iraque e Afeganistão (JOHNSON et. al., 2007; TROTTIER et. al., 2007).

Com relação às meningites bacterianas de origem hospitalar, *Acinetobacter baumannii* surge como o micro-organismo gram-negativo mais frequente no cenário neurocirúrgico

(KIM et. al., 2012) e a frequência de meningite ou ventriculites bacterianas causada por este agente varia de 3,6 a 11,2% dos casos (SACAR et. al. 2006, METAN et. al., 2007; KARAIKOS et. al., 2013). Estas infecções podem ser decorrentes de procedimentos invasivos (craniotomia, implantação de válvulas ventriculares, punções lombares ou anestésias espinhais) ou de traumatismos cranianos complicados (VAN DE BEEK et. al., 2010).

2.3 Antimicrobianos utilizados no tratamento de *A. baumannii*

O tratamento de infecções por *Acinetobacter baumannii* pode ser realizado, principalmente, com beta-lactâmicos associados ou não a inibidores de beta-lactamases, aminoglicosídeos, quinolonas, polimixinas e tigeciclina (MARAGAKIS e PERL, 2008; PELEG et. al., 2008).

2.3.1 Beta-lactâmicos

Os antimicrobianos beta-lactâmicos possuem em comum um anel beta-lactâmico que pode apresentar-se isolado ou conjugado a outro anel, resultando em estruturas bicíclicas. São representados pelas penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos, e, estão entre os mais prescritos em todo o mundo (Drawz e Bonomo, 2010).

O alvo de ação dos beta-lactâmicos é a parede celular bacteriana, composta por camadas de peptidoglicanos formados por N-acetilglicosamina e ácido N-acetilmurâmico, unidos pelas transglicosilases. As camadas de peptidoglicanos são unidas entre si por ligações peptídicas catalisadas por enzimas chamadas transpeptidases. Os beta-lactâmicos inibem as reações de transglicosilação e transpeptidação, resultando na formação de camadas de peptidoglicano fracamente ligadas, que favorecem a lise celular (WILKE et. al., 2005; THANBICHLER e SHAPIRO, 2008).

Entre os diferentes grupos de antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos, os carbapenêmicos são os que apresentam o maior espectro de atividade e eficácia, sendo uma importante opção para o tratamento de infecções graves por *Acinetobacter baumannii* multirresistentes (PAPP-WALLACE et. al., 2011; JEAN et. al., 2013). Para tal são utilizados o imipenem e meropenem, pois o ertapenem tem atividade limitada sobre *A. baumannii* (SHAH e ISAACS, 2003). Nos últimos anos, devido à ampla utilização no ambiente hospitalar, subpopulações resistentes aos carbapenêmicos têm sido selecionadas, e a

frequência de *A. baumannii* resistentes a estas drogas tem aumentado consideravelmente (JONES et. al., 2004; IKONOMIDIS et. al., 2006; SCOTT et. al., 2007; NORSKOV-LAURITSEN et. al., 2009).

A ampicilina associada ao sulbactam também pode ser utilizada para o tratamento de infecções por *A. baumannii* por apresentar com as vantagens tais como a boa penetração nos tecidos, segurança para o paciente e disponibilidade comercial em vários países (HIRAKI et. al., 2013). Resultados de pesquisas clínicas documentam sua eficiência contra infecções moderadas a severas causadas por *A. baumannii* (URBAN et. al., 1993). Apesar dessas vantagens, dados de vigilância indicam a diminuição da sensibilidade a esse antibiótico em cepas de *A. baumannii*, diminuindo sua eficácia (ADNAN et. al., 2013).

2.3.2 Aminoglicosídeos

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. Inicialmente se ligam aos resíduos de carga negativa presentes na membrana externa de bactérias Gram-negativas e nos ácidos teicóicos de Gram-positivas, e posteriormente os grupos hidroxila e amino são os elementos chaves na interação com o RNA da subunidade 30S do ribossomo (BECKER e COOPER, 2103).

O mecanismo de ação dos aminoglicosídeos consiste na interação com a subunidade 30S do ribossomo procariótico. 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 e MOBASHERY, 2001).

Essa classe de antimicrobianos consiste de vários agentes como a gentamicina, amicacina, tobramicina, estreptomicina, neomicina, kanamicina, entre outros. Entre estes, amicacina, gentamicina e tobramicina são os mais prescritos, e a indicação clínica mais comum é no tratamento de infecções graves causadas por bacilos Gram-negativos aeróbios, tais como o *A. baumannii* (BASSETTI et. al., 2013). A amicacina e a tobramicina são os aminoglicosídeos que apresentam melhor eficácia para o tratamento e infecções por *A. baumannii*. Entretanto, a alta toxicidade impede sua utilização por longos períodos, e geralmente, são usados em combinação com outras classes de antimicrobianos (FISHBAIN e PELEG, 2010).

2.3.3 Quinolonas, Polimixinas e Tigeciclina

As quinolonas são compostos sintéticos que inibem a função da topoisomerase IV e da DNA girase, impedindo a ação dessas enzimas no estágio de replicação do DNA. Como resultado, a maquinaria de replicação do DNA é bloqueada na forquilha de replicação, impedindo a síntese de DNA da bactéria (CHENG et. al., 2013). Ciprofloxacina e levofloxacina são as quinolonas mais prescritas em infecções causadas por *A. baumannii*. Entretanto, resistência causada por mutações nos genes *gyrA* e *parcC* e a mediada por bombas de efluxo tem sido relatadas em *A. baumannii*, prejudicando a utilização desses antimicrobianos em pacientes com infecções graves (BOU et. al., 2012; BAKOUR et. al., 2013).

As polimixinas são antimicrobianos polipeptídicos cíclicos fortemente catiônicos, devido à presença de cinco grupos amino livres (BERGEN et. al., 2011; YAHAV et. al., 2011). O mecanismo de ação das polimixinas B e E é idêntico, elas interagem com as moléculas de lipopolissacarídeos (LPS) presentes na membrana externa das bactérias Gram-negativas, levando ao aumento da permeabilidade da membrana que resulta no extravasamento do conteúdo celular (VAARA, 2013). Em alguns casos, a única alternativa para o tratamento de infecções graves causadas por *A. baumannii* multirresistentes são as polimixinas (GIAMARELLOU et. al., 2008), mas, a preocupação com a nefrotoxicidade e neurotoxicidade, limita seu uso (FISHBAIN e PELEG, 2010).

A tigeciclina é o primeiro membro da classe das glicilciclinas, grupo derivado das tetraciclinas com modificações estruturais que aumentam o espectro de ação para Gram-positivos, Gram-negativos e anaeróbicos (STEIN et. al., 2013). Atua sobre a síntese de proteínas bacterianas, ao bloquear a entrada de moléculas de amino-acil do RNA transportador no sítio A do ribossomo, após se ligar à subunidade 30S (STEIN, 2013) e foi desenvolvida para restaurar o espectro de atividade e a utilidade clínica das tetraciclinas (DOAN et. al., 2006). É prescrita, principalmente, no tratamento de infecções de pele e tecidos moles (VAN DUIN et. al., 2013), entretanto, sua utilização em *A. baumannii* multirresistentes incluindo isolados resistentes aos carbapenêmicos e polimixinas, teve um baixo índice de sucesso, como relatado por SHIN e colaboradores (2012).

2.4 Resistência a antimicrobianos em *Acinetobacter baumannii*

Nos últimos cinquenta anos, descritos como a era dos antibióticos, surgiu uma grande diversidade de antimicrobianos que permitiram o tratamento de infecções antes fatais (GUIDOS, 2011). Entretanto, os benefícios trazidos por estas drogas foram acompanhados pelo surgimento de resistência aos antimicrobianos em bactérias patogênicas (DAVIES e DAVIES, 2010).

A resistência bacteriana aos antimicrobianos pode ser resultado de mecanismos intrínsecos ou adquiridos. A resistência intrínseca é a resistência natural exibida por todos os membros de uma espécie, independente de pressão seletiva a que estão submetidas (COX e WRIGHT, 2013). De acordo com o Comitê Europeu para Testes de Susceptibilidade aos Antimicrobianos (EUCAST), *A. baumannii* é intrinsecamente resistente à ampicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, cefazolina, cefotaxima, ceftriaxona, ertapenem, trimetoprim e fosfomicina (http://www.eucast.org/expert_rules/). Devido à atividade do sulbactam, *A. baumannii* não possui resistência intrínseca contra ampicilina/sulbactam (NEMEC, 2009).

A resistência adquirida aos antimicrobianos, por sua vez, resulta da mutação de genes reguladores ou estruturais, e da aquisição de genes de resistência por mecanismos como transformação, conjugação e transdução e, o fenótipo resultante da resistência adquirida não será observado em todos os indivíduos da mesma espécie (DZIDIC & BEDEKOVIC, 2003; MARTINS, A et. al., 2013).

2.4.1 Resistência aos beta-lactâmicos

A resistência aos beta-lactâmicos em *Acinetobacter baumannii* pode resultar de vários mecanismos, como alterações na afinidade de proteínas ligadoras de penicilina, diminuição da permeabilidade da membrana externa devido à modificação da estrutura ou número de porinas, aumento da atividade de bombas de efluxo, e, principalmente pela produção de beta-lactamases (MUNOZ-PRICE e WEINSTEIN, 2008; JAIN e DANZIGER, 2004).

As beta-lactamases são enzimas capazes de hidrolisar o anel beta-lactâmico dos beta-lactâmicos, inativando-os. Podem ser classificadas com base em suas características funcionais (BUSH et. al., 1995) ou por sua estrutura primária (AMBLER, 1980). A classificação mais simples é a de Ambler, na qual, as enzimas são distribuídas em quatro classes (A, B, C e D) de acordo com sua sequência de aminoácidos (BUSH e JACOBY, 2010).

A. baumannii possui beta-lactamases cromossomais, intrínsecas da espécie. A resistência intrínseca a benzilpenicilina, ampicilina, ticarcilina, e piperacilina são mediadas

pela beta-lactamase da classe D de Ambler, OXA-51-like (HOWARD et. al., 2012). Outras enzimas produzidas naturalmente por essa espécie são as cefalosporinases cromossomais não induzíveis do tipo AmpC, também chamadas ADCs (*Acinetobacter derived cephalosporinases*) que hidrolisam penicilinas e cefalosporinas de espectro amplo ou restrito, dependendo da variante (TIAN et. al., 2011).

A partir da década de 90, começaram a ser descritos os *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos. Diversos mecanismos são associados a este fenótipo, tais como a redução da permeabilidade da membrana externa (perda ou expressão reduzida de porinas), superexpressão de bombas de efluxo e produção de carbapenemases. As carbapenemases são um grupo heterogêneo de beta-lactamases, que inclui enzimas das classes A, B e D de Ambler (POIREL e NORDMANN, 2006), como descrito a seguir.

2.4.1.1. Carbapenemases da Classe A de Ambler

As carbapenemases da classe A de Ambler já detectadas em *Acinetobacter baumannii* são GES-14, KPC-2, KPC-3, KPC-4 e KPC-10 (BONNIN et. al., 2011; ROBLEDO et. al., 2010). Essas enzimas são serino-beta-lactamases, capazes de hidrolizar carbapenêmicos, cefalosporinas, penicilinas e azteronam e são inibidas por ácido clavulânico e tazobactam (QUEENAN e BUSH, 2007; GORDON e WAREHAM, 2010).

A família de beta-lactamases tipo GES, (*Guiana extended-spectrum β -lactamase*), originalmente reconhecida como beta lactamases de espectro estendido (ESBL), possui algumas variantes que hidrolisam o imipenem (QUEENAN e BUSH, 2007). Uma delas, GES-14 difere de GES-1 por duas substituições (Gli170Ser e Gli243Ala) e foi identificada em *A. baumannii* na França, conferido resistência a todos os beta-lactâmicos (BONNIN et. al., 2011; ZARRILLI et. al., 2013).

As carbapenemases tipo KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) são consideradas as enzimas de maior importância dentre todas as da classe A. O primeiro relato, de sua detecção ocorreu nos Estados Unidos em 1997, em uma *Klebsiella pneumoniae* (YIGIT et al., 2001). Até o momento já foram descritas 15 variantes de KPC (<http://www.lahey.org/studies/other.asp#table1> acesso em 10/01/2014), e, em *Acinetobacter baumannii*, KPC foi detectada pela primeira vez em 2009, sendo detectadas as KPC-2, KPC-3, KPC-4 e KPC-10 em hospitais de Porto Rico (ROBLEDO et. al., 2010).

2.4.1.2 Carbapenemases da Classe B de Ambler

As enzimas da classe B de Ambler, denominadas metalo-beta-lactamases (MBLs), hidrolisam carbapenêmicos, penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas e oxacefamicinas e não são inibidas pelo ácido clavulânico ou tazobactam, mas são inibidas por EDTA (QUEENAN & BUSH, 2007).

As MBLs podem ser constitutivas ou adquiridas. São constitutivas em uma variedade de bactérias como *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus cereus*, *Legionella gormanii*, *Chryseobacterium meningosepticum* (LIVERMORE et.al., 2000), entretanto, a maioria dessas espécies possui pouca importância clínica (MALTEZOU et.al., 2009). A primeira MBL adquirida foi descrita no Japão em *Serratia marcescens* no ano de 1991, e foi denominada IMP (imipenemase) (WATANABE et. al., 1991; OSANO et. al., 1994).

Além de IMP, nove MBLs adquiridas já foram relatadas: VIM (Verona imipenemase) (LAURETTI et. al., 1999), SPM (São Paulo metalo-beta-lactamase) (TOLEMAN et. al., 2002), GIM (German imipenemase) (CASTANHEIRA et. al., 2004), SIM (Seoul imipenemase) (LEE et. al., 2005), AIM (Australian imipenemase) (YONG et. al., 2007), KHM (Kyorin University Hospital imipenemase) (SEKIGUCHI et. al., 2008), NDM (Nova Deli imipenemase) (YONG et. al., 2009), DIM (Dutsch imipenemase) (POIREL et. al., 2009) e TMB (Tripoli metalo-beta-lactamase) (EL SALABI et. al., 2012). Geralmente, os genes codificadores de MBLs estão em integrons de classe 1, localizados em plasmídeos, e, conseqüentemente podem ser transferidos para outras bactérias, sendo facilmente disseminados (MARAGAKIS e PERL, 2008).

Em *Acinetobacter* spp. já foram descritas as MBLs: IMP-1, IMP-2, IMP-4, IMP-5, IMP-6, IMP-8, IMP-11 (CHU et. al., 2001; POIREL et.al., 2006; HUANG et. al., 2010), VIM-1, VIM-2, VIM-4, VIM-11 (LIM et. al., 2007; LIN et. al., 2010; DI POPOLO et. al., 2011); TMB-2 (SUZUKI et. al., 2013), SIM-1 (LEE et al., 2005); NDM-2 (KAASE et. al., 2011) e SPM-1 (SHAHCHERAGHI et. al., 2011).

2.4.1.3 Carbapenemases da Classe D de Ambler

As carbapenemases da classe D de Ambler são também denominadas oxacilinases (OXA), devido a sua à capacidade de hidrolisar a oxacilina como substrato preferencial. Entretanto, também hidrolisam aminopenicilinas (ampicilina e amoxicilina) e carboxipenicilinas (carbenicilina e ticarcilina). Geralmente não são inibidas por ácido

clavulânico, tazobactam e sulbactam, mas sim por NaCl, propriedade exclusiva dessas beta-lactamases, que pode ser usada como um diferencial na identificação das enzimas desta classe (POIREL et. al., 2010; WALSH, 2010; MIRIAGOU et. al., 2010).

Até o momento, já foram descritas 365 variantes de OXA com diferentes espectros de ação, variando de cefalosporinases de amplo espectro a carbapenemases (<http://www.lahey.org/studies/other.asp#table1> acesso em 10/01/2014) (BOO et. al., 2009; TURTON et. al., 2010; HUANG et. al., 2010).

O primeiro relato de uma serino-beta-lactamase capaz de hidrolisar o imipenem em *A. baumannii* ocorreu em 1993, na Escócia. Essa enzima, previamente denominada ARI-1 (*Acinetobacter resistant imipenem*), apresentou sequência de aminoácidos homóloga à das enzimas da classe D, e, por isso, foi denominada OXA-23 (PATON et. al., 1993).

A habilidade de OXA-23 em hidrolisar os carbapenêmicos permitiu a definição de um novo grupo de enzimas do tipo OXA, com atividade de carbapenemases, este grupo foi nomeado CHDLs (*Carbapenem-Hydrolysing class D enzymes*) (POIREL e NORDMANN, 2006). As CHDLs, carbapenemases mais freqüentes em *A. baumannii*, não hidrolisam cefalosporinas de amplo espectro e a capacidade de hidrolisar carbapenêmicos é 100 a 1000 vezes menor quando comparadas às MBLs. Estão divididas em cinco subgrupos filogenéticos de acordo com a homologia de sua sequência de aminoácidos, assim nomeados: *bla*_{OXA-23like}, *bla*_{OXA-51like}, *bla*_{OXA-58like}, *bla*_{OXA24-40like}, e *bla*_{OXA-143like} (POIREL et. al., 2010).

O subgrupo de OXA-23 inclui as enzimas OXA-27, OXA-49, OXA-73, OXA-102, OXA-103, OXA-105, OXA-133 e OXA-134. No Brasil, a primeira descrição de OXA-23 em *A. baumannii* foi em 2003, durante um surto na cidade de Curitiba (DALLA-COSTA et. al., 2003). Após, ocorreram novos relatos de disseminação de diferentes clones produtores de OXA-23 no Rio de Janeiro e em outras regiões do Brasil (CARVALHO et. al., 2009; MARTINS, N. et. al., 2009; OPAZO et. al., 2012). O gene *bla*_{OXA-23} em *A. baumannii* já foi detectado em plasmídeos e cromossomos, associados a elementos genéticos como transposons Tn 2006, Tb2007, Tn 2008 e seqüências de inserção *ISAbal* e *ISAb4* (POIREL et. al., 2010).

O maior subgrupo das carbapenemases do tipo OXA é o grupo OXA-51-like, que contém as enzimas naturais localizadas nos cromossomos de *A. baumannii*. As enzimas desse subgrupo diferem por 1 a 15 aminoácidos (EVANS et. al., 2008; WALTHER-RASMUSSEN e HOIBY, 2006).

O gene *bla*_{OXA-51-like}, intrínseco de *A. baumannii* confere resistência aos carbapenêmicos somente quando associado à elementos de inserção tipo *ISAbal* ou *ISAb9*,

localizados *upstream* ao gene, agindo como forte promotor transcricional (TURTON et. al., 2006). As enzimas presentes nesse subgrupo são OXA-51, OXA-64, OXA-65, OXA-66, OXA-67, OXA-68, OXA-69, OXA-70, OXA-71, OXA-75, OXA-76, OXA-77, OXA-78, OXA-79, OXA-80, OXA-82, OXA-83, OXA-84, OXA-86, OXA-87, OXA 88, OXA-89, OXA-90, OXA-91, OXA-92, OXA-93, OXA-94, OXA-95, OXA-104, OXA-106, OXA-107, OXA-108, OXA-109, OXA-110, OXA-111, OXA-112, OXA-113, OXA-115, OXA-116, OXA-117, OXA-130, OXA-131 e OXA-132 (QUEENAN e BUSH, 2007; POIREL et. al., 2010; LIVERMORE, 2012).

O subgrupo OXA-24 (também chamado OXA-40) compreende as variantes OXA-25, OXA-26, OXA-33 e OXA-72 que diferem por um a cinco aminoácidos e apresentam aproximadamente 60% de homologia com os outros subgrupos de OXA (WANG et. al., 2007; QUEENAN e BUSH, 2007; POIREL et. al., 2010). Essas enzimas podem ser codificadas por genes de localização cromossomal ou plasmidial, e, são menos disseminadas que OXA-23 (WALSH, 2010).

O subgrupo OXA-58, inicialmente detectado em um *Acinetobacter baumannii* isolado na França em 2003 (POIREL et. al., 2005), inclui, além da enzima OXA-58, as variantes OXA-96 e OXA-97. Atualmente, encontra-se disseminado em várias partes do mundo (BONNIN et. al., 2013; METAN et. al., 2013; et. al., 2013; VILLALÓN et. al., 2013). Enzimas deste grupo apresentam menos de 50% de homologia com os outros subgrupos de OXA e *bla*_{OXA-58} já foi encontrado associado à *ISAbal*, *ISAb2* e *ISAb3* (POIREL et. al., 2010).

A enzima OXA-143 está em um subgrupo distinto, possui atividade contra penicilinas e carbapenêmicos e foi detectada pela primeira vez no Brasil em 2004 por HIGGINS e colaboradores (2009). Há relatos dessa enzima em *A. baumannii* isolados de hospitais de São Paulo, Rio de Janeiro e Londrina (DALLA-COSTA et.al., 2003; HIGGINS et. al., 2009; CARVALHO et. al., 2009; GIONCO et. al.; 2012).

A disseminação desses genes de carbapenemases em *A. baumannii* ocorre devido à elementos genéticos móveis como plasmídeos, sequências de inserção (IS), transposons (Tns), integrons (Int), entre outros (DOMINGUES et. al., 2012).

Integrons são elementos genéticos capazes de integrar, expressar e trocar genes cassetes (CAMBRAY et al., 2010; DOMINGUES et. al., 2012). Até o momento já foram descritas cinco classes de integrons, com base nas sequências de suas respectivas integrases, sendo os de classe 1, 2 e 3 mais associados à fenótipos de multirresistência aos antimicrobianos. Em *A. baumannii*, integrons de classe 1 e 2 tem sido descritos associados a

surtos de infecção em hospitais (KARAH et. al., 2011; PEYMANI et. al., 2012; SAULE et. al., 2013). As sequências de inserção (IS) são pequenos elementos genéticos, (raramente ultrapassam 2 Kb), abundantes em genomas microbianos (MUGNIER et. al., 2009). Em *A. baumannii*, as IS desempenham um importante papel na expressão de genes de resistência aos carbapenêmicos, principalmente *ISAbal*, exclusiva desta espécie. Outras IS associadas à genes de carbapenemases em *A. baumannii* são *ISAb3*, *ISAb4* e *IS18* (VILLALON et. al., 2013).

2.6 Resistência aos aminoglicosídeos em *Acinetobacter*

A resistência aos aminoglicosídeos pode ser atribuída a vários mecanismos, como modificação do alvo ribossomal, efluxo do antimicrobiano e modificação enzimática (VAKULENKO e MOBASHERY, 2003). O principal mecanismo de resistência em bactérias Gram-negativas é a produção de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EMAs) (RAMIREZ e TOLMASKY, 2010; WACHINO e ARAKAWA, 2012).

As EMAS catalisam a modificação dos grupos $-OH$ ou $-NH_2$ dos aminoglicosídeos e são de três tipos, as nucleotidiltransferases (ANTs), fosfotransferases (APHs) e acetiltransferases (AACs) (SHAW et al., 1993). Os genes que codificam estas enzimas podem estar localizados em plasmídeos, transposons e integrons, o que os tornam móveis e com alta capacidade de disseminação (NEMEC et. al., 2004; DIJKSHOORN et. al., 2007).

Existem dois sistemas de nomenclatura para as EMAs, uma delas consiste de um 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. A outra nomenclatura possui uma perspectiva genética, apresentando três letras minúsculas em itálico para o tipo de atividade da enzima (*aph*, *aac*, *aad*), uma letra maiúscula para o sítio de modificação e um número para indentificar cada gene, por exemplo, *aphA-1* (BECKER e COOPER, 2013).

Os genes codificadores de EMAs estão localizados em elementos genéticos móveis junto com outros determinantes de resistência como beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) e carbapenemases resultando em isolados multirresistentes (RAMIREZ e TOLMASKY, 2010).

2.6.1 Acetiltransferases (AACs)

As acetiltransferases modificam os aminoglicosídeos transferindo um grupo acetil da acetil-coenzima A (AcCoA) para um grupo amino deste, produzindo acetilaminoglicosídeo e coenzima A (CoASH) como produto (CALDWELL e BERGHUIS, 2012). Essas enzimas catalisam a acetilação das posições 1 [AAC(1)], 3 [AAC(3)-I], 2' [AAC(2')] ou 6' [AAC(6')], resultando em quatro classes (RAMIREZ e TOLMASKY, 2010).

As AAC(6') são as EMAs mais frequentes e importantes, 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, kanamicina, entre outros. Até o presente, pelo menos 24 genes que codificam variantes de AAC(6')-I foram descritos (NIGRO, et. al., 2011). As AAC(3)s constituem o segundo grupo mais comum de acetiltransferases e modificam gentamicina, sisomicina e fotimicina (BECKER e COOPER, 2013).

Em *Acinetobacter 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). Os genes que as codificam estão localizados em elementos genéticos móveis tais como plasmídeos e transposons (VAKULENKO e MOBASHERY, 2003; LAMBERT, 2012).

2.6.2 Fosfotransferases (APHs)

As fosfotransferases transferem um grupo fosfato do ATP ou GTP, na presença de Mg^{2+} , para um grupo hidroxila do aminoglicosídeo, resultando em fosfoaminoglicosídeo e ADP ou GDP (WRIGHT e THOMPSON, 1999). As classes e subclasses de fosfotransferases já descritas são: APH(3')-I a VII, APH(2'')I a IV, APH(3'')-I, APH(4)-I, APH(7'')-I, APH(6')-I e APH(9')-I (RAMIREZ e TOMALSKY, 2010).

A maior classe, em número de enzimas, é a das fosfotransferases 3' [APH(3')] que modificam os grupos hidroxila dos aminoglicosídeos na posição 3 e, desta classe, a subclasse mais prevalente em Gram-negativos é das enzimas APH(3')-I que conferem resistência a kanamicina, neomicina, paramomicina, ribostamicina e lividomicina e alguns desses genes, como *aph(3')-Ia*, são utilizados em vetores de clonagem (VAKULENKO e MOBASHERY, 2003). Outra importante subclasse destas enzimas é APH(3')-VI, codificadas pelo gene *aph(3')-VI*. Esse gene foi descrito pela primeira vez em um isolado de *A. baumannii*

(MARTIN et. al., 1988), e, até os dias atuais, apresenta-se como a fosfotransferase mais frequente em *A. baumannii*, conferindo resistência à amicacina, isepamicina, kanamicina, neomicina entre outros (VAKULENKO e MOBASHERY, 2003; BECKER e COOPER, 2013).

2.6.3 Nucleotidiltransferases (ANTs)

As nucleotidiltransferases transferem um grupo adenilato do ATP ao grupo hidroxila do aminoglicosídeo, resultando em adenililaminoglicosídeo e pirofosfato. Compreendem cinco classes: ANT(2''), ANT(3''), ANT(4'), ANT(6), ANT(9) (RAMIREZ e TOLMASKY, 2010). Apesar de ser a menor família de EMAs em número, possuem significativa importância clínica, pois ANT(2'') confere resistência à amicacina, tobramicina e gentamicina, que são os aminoglicosídeos mais frequentemente prescritos (AVENT et. al., 2011). O gene ANT(2'')-Ia é amplamente distribuído, sendo localizado em plasmídios e transposons encontrados tanto em patógenos da família *Enterobacteriaceae* quanto em bacilos Gram-negativos não-fermentadores. Em *Acinetobacter baumannii* já foram relatados ANT(2'')-Ia, ANT(3'')-Ia e ANT(3'')-Id (KARAH, 2011).

2.7 Tipagem molecular

Diversos métodos moleculares têm sido utilizados para a tipagem molecular de patógenos bacterianos (FOXMAN e RILEY, 2001). Estas técnicas podem ser baseadas na análise de ácidos nucleicos, de proteínas e da expressão de genes. Entre elas, as técnicas de ribotipagem, PFGE, RAPD, ERIC-PCR e REP-PCR têm sido descritas como eficientes para a tipagem molecular de patógenos bacterianos (DURMAZ et. al., 2009; SADER et. al., 1995; SINGH et. al., 2006; HIGGINS et. al., 2012). Em nosso estudo, optamos pela técnica de REP-PCR para a tipagem molecular de *Acinetobacter baumannii*.

A reação em cadeia da polimerase de elementos extragênicos repetitivos (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).

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos, detectar genes de carbapenemases e de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos e determinar a similaridade genética entre os isolados de *A. baumannii* do Hospital de Base da Fundação Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos nos isolados de *A. baumannii*.
- Identificar entre bactérias do complexo *A. baumannii*-*A. calcoaceticus* isolados que pertençam à espécie *A. baumannii*.
- Investigar a presença dos genes de MBLs *bla*_{IMP}, *bla*_{SPM} e *bla*_{VIM}.
- Investigar a presença dos genes de carbapenemases da classe A de Ambler *bla*_{GESE} e *bla*_{KPC}.
- Investigar a presença dos genes de carbapenemases da classe D de Ambler *bla*_{OXA-23like}, *bla*_{OXA-51like}, *bla*_{OXA-24like}, *bla*_{OXA-48like}, *bla*_{OXA-58like} e *bla*_{OXA-143like}.
- Investigar a presença de IS*AbaI* “upstream” aos genes de CHDLs detectados.
- Investigar a presença dos genes de EMAs: acetiltransferases (*aac*), fosfotransferases (*aph*) e nucleotidiltransferases (*ant*).
- Determinar a similaridade genética dos *A. baumannii* por REP-PCR.

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção dos Isolados

Foram selecionados para o estudo, um total de cem isolados previamente identificados como pertencentes ao complexo *Acinetobacter baumannii* - *Acinetobacter calcoaceticus* coletados de julho a dezembro de 2012 no setor de Microbiologia do Laboratório Central do Hospital de Base de São José do Rio Preto (HB). Estes isolados foram obtidos a partir de culturas positivas de diversos espécimes clínicos, como sangue, urina, aspirado traqueal, lavado bronco-alveolar, fragmentos de tecidos para biópsias e cateteres. Todos os isolados foram resistentes aos carbapenêmicos (imipenem e meropenem) e provenientes de culturas de pacientes admitidos em unidades de terapia intensiva do HB. As UTIs incluídas neste estudo foram: UTI Geral SUS (7º Andar), UTI Geral Convênio (7º andar), UTI Emergência (Subsolo), UTI Semi-intensiva (5º Andar), UTI Neonatal (4º Andar), UTI Cardiológica Adulto (5º Andar) e UTI Cardiológica Pediátrica (5º Andar).

4.2 Identificação e determinação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos

A identificação e o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA) dos isolados foram realizados no equipamento Vitek[®]2 Compact System (Biomerieux, France) utilizando a técnica de microdiluição em caldo automatizada durante a rotina do laboratório central do HB.

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 DensichekTM (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. Os antimicrobianos testados para o complexo *A. baumannii*-

A. calcoaceticus foram: ampicilina/sulbactam, piperacilina/tazobactam, ceftazidima, cefepima, imipenem, meropenem, ampicilina, gentamicina, ciprofloxacina, tigeciclina e colistina.

Os antimicrobianos polimixina B, piperacilina/tazobactam e ampicilina foram testados manualmente (método de disco-difusão) para confirmação de resultados. A interpretação do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos foi conduzida de acordo com as recomendações estabelecidas no documento M100-S21 (CLSI, 2012) como mostrado na Tabela 1. Os testes de identificação e de suscetibilidade aos antimicrobianos foram realizados pela equipe do Laboratório de Microbiologia do Laboratório Central do HB.

Tabela 1: Padrões de Interpretação de valores de halo e CIM para *Acinetobacter* spp. segundo CLSI.

Agente Antimicrobiano	Conteúdo do Disco	Critério Interpretativo Halo de inibição (mm)			Critério Interpretativo CIM (µg/mL)		
		S	I	R	S	I	R
β-lactâmicos/Inibidores de β-Lactamases							
Piperacilina/Tazobactam (TZP)	100/10 µg	≥ 21	18–20	≤ 17	≤ 16/4	32/4–64/4	≥ 128/4
Ampicilina/Sulbactam (SAM)	10/10 µg	≥ 15	12–14	≤ 11	≤ 8/4	16/8	≥ 32/16
Cefalosporinas							
Ceftazidima (CAZ)	30 µg	≥ 18	15–17	≤ 14	≤ 8	16	≥ 32
Cefepima (FEP)	30 µg	≥ 18	15–17	≤ 14	≤ 8	16	≥ 32
Cefotaxima (CAZ)	30 µg	≥ 21	14–10	≤ 13	≤ 8	16–32	≥ 64
Carbapenêmicos							
Imipenem (IMI)	10 µg	≥ 16	14–15	≤ 13	≤ 4	8	≥ 16
Meropenem (MEM)	10 µg	≥ 16	14–15	≤ 13	≤ 4	8	≥ 16
Lipopeptídeos							
Polimixina B (PB)	-	-	-	-	≤ 2	-	≥ 4
Colistina (COL)	-	-	-	-	≤ 2	-	≥ 4
Aminoglicosídeos							
Amicacina (AK)	30 µg	≥ 17	15–16	≤ 14	≤ 16	32	≥ 64
Gentamicina (CN)	10 µg	≥ 15	13–14	≤ 12	≤ 4	8	≥ 16
Fluoroquinolonas							
Ciprofloxacina (CIP)	5 µg	≥ 21	16–20	≤ 15	≤ 1	2	≥ 4

S: Sensível; I: Intermediário; R: resistente

4.3 Armazenamento e manutenção dos isolados

Após a realização da identificação e dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos, os isolados clínicos resistentes aos carbapenêmicos imipenem e meropenem foram encaminhados ao Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), onde foram repicados em ágar MacConkey (Himedia, Mumbai, Índia) e mantidos em coleção de cultura em freezer a -80 °C. Para isso, uma colônia isolada obtida da placa foi inoculada em caldo TSB (“Tryptic Soy Broth”, BACTO™, França) a 37

°C por 16 a 18 horas. Após este tempo, 0,7 mL de cada cultura foi transferida para criotubos estéreis previamente rotulados, onde foram adicionados 0,3 mL de glicerol 50% estéril. Para cada isolado, o armazenamento foi realizado em triplicata e cada criotubo identificado com um número da coleção de cultura e data de armazenamento. Paralelamente, os dados relativos a cada isolado clínico foram armazenados em uma planilha, contendo informações como número de identificação na coleção de cultura, sempre precedido pelo número do prontuário do paciente, data, espécime de isolamento, unidade de internação e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos.

4.4 Extração de DNA genômico bacteriano

As cepas armazenadas a -80 °C foram reativadas através de cultivo em caldo TSB por 16 a 24 horas a 37 °C em agitação. Em seguida, uma alíquota de 1,5 mL da suspensão bacteriana foi centrifugada a 15000 g por 10 minutos e o sobrenadante descartado, essa massa celular obtida (pellet) foi utilizada para a extração do DNA genômico bacteriano. O “pellet” foi homogeneizado em 200 µL de água Milli-Q e submetido à nova centrifugação a 15000 g por 10 minutos, em seguida, após o descarte do sobrenadante, o “pellet” foi suspenso em 40 µL de água Milli-Q e incubado a 100 °C por 10 minutos.

Após a fase de lise e 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 incubado em gelo por 20 minutos. Após a incubação, a amostra foi centrifugada a 16000g por 10 minutos, o sobrenadante descartado e 300 µl de etanol 70% (-20 °C) adicionados à amostra, em seguida, as etapas de homogeneização e centrifugação foram repetidas. O sobrenadante foi descartado e, após a secagem, o DNA foi ressuspenso com 100 µL de tampão TE e 2 µL de RNase (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 (tabela 2). Um par de primers específico para amplificar a região intergênica específica da espécie *A. baumannii* (região ITS) e outro par para amplificar uma região altamente conservada do gene *recA* de *Acinetobacter* spp (adicionado à reação com função de controle interno). Como controle negativo foi utilizada a cepa ATCC de *Escherichia coli* 25922, o protocolo da PCR encontra-se na Tabela 2 e a sequência dos primers, na Tabela 3.

Tabela 2: Protocolo da Duplex-PCR realizada para a identificação de *Acinetobacter 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
Primer Ab-ITS F (10 mM)	1,0 µl
Primer Ab-ITS R (10 mM)	1,0 µl
Primer recA F (10 mM)	1,0 µl
Primer recA R (10 mM)	1,0 µl
Taq-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*).

Tabela 3: *Primers* utilizados para identificação de *A. baumannii*, para investigação de genes de carbapenemases e para a tipagem molecular por REP-PCR.

Alvo de amplificação	Primers	Sequências 5' a 3'	Temperatura de anelamento	Tamanho Amplicon (pb)	Referência	
Identificação de <i>Acinetobacter baumannii</i>						
gene <i>recA</i> gênero <i>Acinetobacter</i>	recA-F	CCTGAATCTTCTGGTAAAAC	55	425 pb	Chen et al., 2007	
	recA-R	GTTTCTGGGCTGCCAAACATTAC				
gene <i>16S-23S rRNA A. baumannii</i>	ITSAb-F	CATTATCACGGTAATTAGTG	55	208 pb		
	ITSAb-R	AGAGCACTGTGCACCTAAG				
Carbapenemases da classe D (tipo OXA)						
gene <i>bla</i> _{OXA-23like}	OXA23-F	GATCGGATTGGAGAACCAGA	52	501pb	Woodford et al., 2006	
	OXA23-R	ATTTCTGACCGCATT TCCAT				
gene <i>bla</i> _{OXA-24like}	OXA24-F	GGTTAGTTGGCCCC TAAA	52	246pb		
	OXA24-R	AGTTGAGCGAAAAGGGGATT				
gene <i>bla</i> _{OXA-51like}	OXA51-F	TAATGCTTTGATCGGCCCTTG	52	353pb		
	OXA51-R	TGGATTGCACCTTCATCTTGG				
gene <i>bla</i> _{OXA-58like}	OXA58-F	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG	52	599pb		
	OXA58-R	CCCCTCTGCGCTCTACATAC				
gene <i>bla</i> _{OXA-143like}	OXA143-F	TGGCACTTTCAGCAGTTCCT	55	149 pb		Higgins et al., 2010
	OXA143-R	TAATCTTGAGGGGGCCAACC				
gene <i>bla</i> _{OXA-48like}	OXA48-F	TTGGTGGCATCGATTATCGG	50	744 pb	Queenan&Bush, 2007	
	OXA48-R	GAGCACTTCTTTGTGATGGC				
final do gene <i>bla</i> _{OXA-23like}	OXA23all-R	TCACAACAACATAAAAGCACTG	52	-	Afzal-Shah et al. 2001	
final do gene <i>bla</i> _{OXA-51like}	OXA51all-R	CTATAAAATACCTAATTGTTC	46	-	Turton et al., 2006	
Sequência de Inserção						
<i>ISAbal</i>	ISAbal-F	CACGAATGCAGAAGTTG	50	-	Segal et. al., 2005	
	ISAbal Int-F	CGACGAATACTATGACAC	50	Sequenciamento		
Carbapenemases da classe B (MβLs)						
gene <i>bla</i> _{IMP}	IMP1-F	TGAGCAAGTTATCTGTATTTC	50	740	Yan et al., 2001	
	IMP1-R	TTAGTTGCTTGGTTTTGATG				
gene <i>bla</i> _{SPM}	SPM1A-F	CTGCTTGGATTCATGGGCGC	58	784	Pitout et al., 2005	
	SPM1B-R	CCTTTCCGCGACCTTGATC				
gene <i>bla</i> _{VIM}	VIM1-F	TCTACATGACCGCTGTGTC	55	748	Poirel et al., 2000a.	
	VIM1-R	TGTGCTTTGACAACGTTCCG				
Carbapenemases da classe A						
gene <i>bla</i> _{KPC}	KPC2-F	TGCACTGTATCGCCGTC	51	1009 pb	Yigit, et al., 2011	
	KPC2-R	TCAGTGCTCTACAGAAAAACC				
gene <i>bla</i> _{GES}	GES1A-F	ATGCGCTTCATTACGCAC	53	864	Poirel et al., 2000b.	
	GES1B-R	CTATTGTCCGTGCTCAGG				
Tipagem molecular REP-PCR						
Sequências extragênicas repetitivas	REP1	IIIGCGCCGICATCAGGC	45	-	Bou et al., 2000	
	REP2	ACGTCTTATCAGGCCTAC				

4.6 Investigação de genes de resistência por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

4.6.1 Genes de carbapenemases da classe D (Multiplex-PCR)

A investigação de carbapenemases do tipo OXA-58like, OXA-23like, OXA-51like e OXA-24like foi realizada por Multiplex-PCR segundo *primers* e protocolo de WOODFORD e colaboradores (Tabelas 3 e 4, respectivamente). A ciclagem utilizada foi de desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de trinta ciclos de 95°C por 25 segundos, 52°C por 40 segundos, 72°C por 50 segundos e extensão final a 72°C por 6 minutos.

Tabela 4: Protocolo de Multiplex-PCR para detecção de carbapenemases do tipo OXA.

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
Primer OXA-58F (20 mM)	0,25 µl
Primer OXA-58R (20 mM)	0,25 µl
Primer OXA-23F (20 mM)	0,25 µl
Primer OXA-23R (20 mM)	0,25 µl
Primer OXA-24F (20 mM)	0,25 µl
Primer OXA-24R (20 mM)	0,25 µl
Primer OXA-51F (20 mM)	0,25 µl
Primer OXA-51R (20 mM)	0,25 µl
Taq-DNA polimerase (5U/ µl)	0,2 µl
Água Ultrapura	q.s.p. 20 µl
DNA (100 ng/µl)	1,0 µl

Foi utilizada uma reação isenta de DNA como controle negativo e como controles positivos cepas carreadoras dos genes pesquisados gentilmente cedidas pela professora Dr^a. Ana Cristina Gales (Laboratório ALERTA /UNIFESP). Os produtos amplificados foram visualizados de acordo com o item 4.5.

4.6.2 Genes de carbapenemases das Classes A, B e D

Para a investigação de carbapenemases da classe D *bla*_{OXA-143like} e *bla*_{OXA-48like}; genes de carbapenemases da classe A *bla*_{KPC} e *bla*_{GES} e genes de carbapenemases da classe B *bla*_{IMPlike}, *bla*_{SPMlike}, *bla*_{VIMlike} foram realizadas PCRs de acordo com *primers* e protocolo Tabelas 3 e 5, respectivamente.

Tabela 5: Protocolo de PCR para detecção de carbapenemases das classes A, B e D.

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

A ciclagem foi a mesma para os diferentes genes, com modificação apenas da temperatura de anelamento: o DNA foi desnaturado inicialmente a 95 °C por 3 minutos, e em seguida, o material foi submetido a 30 ciclos de desnaturação por 1 minuto à 95 °C, anelamento por 1 minuto à temperatura de ideal de cada *primer* (Tabela 3), extensão por 1 minuto à 72 °C e extensão final por 10 minutos a 72 °C.

Foi utilizada uma reação isenta de DNA como controle negativo e como controles positivos foram utilizadas cepas carreadoras dos genes pesquisados gentilmente cedidas pela professora Dr^a. Ana Cristina Gales (Laboratório ALERTA /UNIFESP). Os produtos amplificados foram visualizados de acordo com o item 4.5.

4.6.3 Investigação da Associação da Sequência de Inserção *ISAbal* e de *bla*_{OXA-23like} e à *bla*_{OXA-51like}

A presença da sequência de inserção do tipo *ISAbal* ‘*upstream*’ aos genes *bla*_{OXA-23like} e à *bla*_{OXA-51like} nos isolados estudados foi investigada por uma reação de PCR utilizando *primers* *ISAbal*-F e *OXA23all*-R e *ISAbal*-F e *OXA51all*-R (Tabelas 3 e 5). O termociclador foi programado da seguinte maneira: desnaturação inicial a 95 °C por 5

minutos, e em seguida, 35 ciclos de amplificação, sendo cada ciclo composto por desnaturação à 95 °C por 45 segundos, anelamento à temperatura de 50 °C (para OXA-23) e 45 °C (para OXA-51) por 45 segundos e extensão à 72 °C por 3 minutos, e, para finalizar, extensão a 72 °C por 10 minutos. Os produtos amplificados foram visualizados de acordo com o item 4.5.

4.6.4 Investigação de genes de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos

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 conservado em espécies bacterianas foi adicionado como controle interno da reação. Os protocolos das reações triplex e duplex estão descritos nas Tabelas 6 e 7 e os *primers* utilizados, na Tabela 8.

Tabela 6: Protocolo das reações triplex 1 e triplex 2 para aminoglicosídeos.

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
Primer <i>aac(3)Ia-F</i> (10 mM)	Primer <i>aph(3)VI-F</i> (10 mM)	0,3 µl
Primer <i>aac(3)Ia-R</i> (10 mM)	Primer <i>aph(3)VI-R</i> (10 mM)	0,3 µl
Primer <i>aac(3)IIa-F</i> (10 mM)	Primer <i>ant(2)Ia-F</i> (10 mM)	0,3 µl
Primer <i>aac(3)IIa-R</i> (10 mM)	Primer <i>ant(2)Ia-R</i> (10 mM)	0,3 µl
Primer <i>aac(6)Ih-F</i> (10 mM)	Primer <i>rrn-F</i> (10 mM)	0,3 µl
Primer <i>aac(6)Ih-R</i> (10mM)	Primer <i>rrn-R</i> (10mM)	0,3 µl
Taq-DNA polimerase (5U/ µl)	Taq-DNA polimerase (5U/ µl)	0,2 µl
Água Ultrapura	Água Ultrapura	q.s.p. 25 µl
DNA (100 ng/µl)	DNA (100 ng/µl)	1,0 µl

Tabela 7: Reação de PCR-Duplex para detecção de EMAs

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
Primer aph(3)Ia-F(10 mM)	0,3 µl
Primer aph(3)Ia-R (10 mM)	0,3 µl
Primer aac(6)Ib-F(10 mM)	0,3 µl
Primer aac(6)Ib-R(10 mM)	0,3 µl
Taq-DNA polimerase (5U/ µl)	0,2 µl
Água Ultrapura	q.s.p. 25 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.

Tabela 8: *Primers* utilizados nas reações de PCR para a investigação de genes de resistência aos aminoglicosídeos (AKERS et. al., 2010).

Alvo de amplificação	Primers	Sequências 5' a 3'	Temperatura de anelamento	Tamanho Amplicon (pb)	Referência
N-Acetiltransferases					
gene <i>aac(6')-Ih</i> (Triplex 1)	aac(6)Ih-F	TGCCGATATCTGAATC	49	407	Akers et al, 2010
	aac(6)Ih-R	ACACCACACGTCAG			
gene <i>aac(3)-Ia</i> (Triplex 1)	aac(3)Ia-F	GACATAAGCCTGTTCCGGTT	49	372	Akers et al, 2010
	aac(3)Ia-R	CTCCGAACTCACGACCGA			
gene <i>aac(3)-IIa</i> (Triplex 1)	aac(3)IIa-F	ATGCATACGCGGAAGGC	49	822	Akers et al, 2010
	aac(3)IIa-R	TGCTGGCACGATCGGAG			
gene <i>aac(6')-Ib</i> (Duplex)	aac(6)Ib-F	TATGAGTGGCTAAATCGAT	54	395	Akers et al, 2010
	aac(6)Ib-R	CCCCTTTCTCGTAGCA			
O-Fosfotransferases					
gene <i>aph(3')-VI</i> (Triplex 2)	aph(3)VI-F	CGGAAACAGCGTTTTAGA	49	716	Akers et al, 2010
	aph(3)VI-R	TTCCTTTTGTCCAGGTC			
gene <i>aph(3')-Ia</i> (Duplex)	aph(3)Ia-F	CGAGCATCAAATGAAACTGC	54	623	Akers et al, 2010
	aph(3)Ia-R	GCGTTGCCAATGATGTTACAG			
O-Nucleotidiltransferases					
gene <i>ant(2)-Ia</i> (Triplex 2)	ant(2)Ia-F	ATCTGCCGCTCTGGAT	49	404	Akers et al, 2010
	ant(2)Ia-R	CGAGCCTGTAGGACT			
Controle interno reação					
gene <i>rrn</i> (16S rRNA) (Triplex 2)	rrn-F	GAGGAAGGTGGGGATGACGT	49	216	Akers et al, 2010
	rrn-R	AGGCCCGGGAACGTATTAC			

4.7 Purificação dos produtos de PCR para sequenciamento

Os produtos obtidos das reações de PCR positivas para os genes investigados foram purificados com etanol, de acordo com protocolo adaptado de Sambrook e Russel (2001). Os “*amplicons*” foram inicialmente transferidos para tubos de 1,5 ml onde foi realizada a purificação. À estes tubos foram adicionados 3 µL de acetato de sódio 3 M seguido de 150 µL de etanol 100%. Os tubos foram incubados em freezer -80 °C por 20 minutos para que o DNA fosse precipitado, em seguida foram centrifugados a 16100 g por 20 minutos a 4 °C e o sobrenadante descartado. Ao DNA precipitado foram adicionados 100µL de etanol a 70% (*Merck Chemicals*) e, em seguida, este foi centrifugado por 10 minutos a 16100 g, à 4 °C. O DNA foi ressuspensionado em 20 µl de água ultra-pura (*Invitrogen*).

4.8 Sequenciamento dos genes

O sequenciamento dos genes detectados foi realizado com o kit Big Dye Terminator v3.1 (*Applied Biosystems, USA*), segundo recomendações do fabricante e teve como finalidade confirmar se os “*amplicons*” obtidos na PCR correspondiam aos genes investigados. Os *primers* utilizados no sequenciamento foram os mesmos utilizados na reação

de PCR. A reação de PCR para sequenciamento foi realizada com 2,0 μL de “Big Dye Terminator”, 4,0 μL de solução tamponante (5X), 1,0 μL de primer específico (3,2 μM), 1,0 μL de DNA purificado com concentração aproximada de 200 ng/mL e água q.s.p. 20 μL . A ciclagem foi de 25 ciclos de desnaturação a 96 °C por 30 segundos, anelamento à 50 °C por 15 segundos, extensão à 60 °C por 4 minutos.

O sequenciamento foi realizado no aparelho 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems Foster City, CA) e as sequências comparadas às existentes no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast).

4.9 Tipagem molecular dos isolados de *A. baumannii* pelo método de REP-PCR

A REP-PCR foi o método escolhido para avaliar a similaridade genética entre os isolados, esse método é baseado na amplificação de elementos de repetição extragênicos do DNA genômico bacteriano. Os *primers* e protocolo estão descritos na Tabela 3 e 9, respectivamente.

Tabela 9: Protocolo REP-PCR utilizado no estudo.

Componentes	Volume
Tampão para PCR (10X)	2,5 μl
MgCl ₂ (25mM)	3,0 μl
Mistura de nucleotídeos dNTP (2,5 mM)	2,0 μl
Primer REP1 (10 mM)	1,25 μl
Primer REP2 (10 mM)	1,25 μl
Taq-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 1,5% 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 perfis eletroforéticos foram analisados utilizando o programa Bionumerics (Applied Maths, Bélgica). A similaridade genética entre os isolados foi determinada pelo índice de similaridade de Dice, e o dendrograma, construído segundo o método UPGMA

(*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*), 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.

Resultados e Discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação de *Acinetobacter baumannii*

Os isolados do complexo *A. baumannii* - *A. calcoaceticus* previamente identificados pelo sistema automatizado Vitek 2 foram submetidos a duplex-PCR utilizando-se *primers* específicos para a detecção dos fragmentos correspondentes à região intergênica específica da espécie *A. baumannii* (região ITS) e ao gene *recA* de *Acinetobacter* spp. (208 e 425 pb, respectivamente). Todos os isolados avaliados apresentaram os dois fragmentos (Figura 1), e foram, portanto confirmados como pertencentes à espécie *Acinetobacter baumannii*. Assim, neste estudo, a utilização do duplex-PCR para a identificação de *A. baumannii* foi eficiente, mas técnicas mais complexas como o sequenciamento de fragmentos do gene *rpoB* (LA SCOLA et. al., 2006) devem ser utilizados e são necessários em estudos que incluam outras espécies de *Acinetobacter*, tais como *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter pittii* e *Acinetobacter nosocomialis* são necessárias.

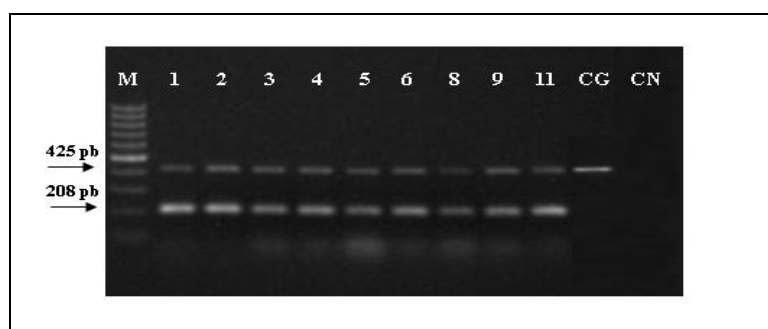


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose mostrando o produto de amplificação dos genes da região ITS específica da espécie *A. baumannii* (208 pb) e da região do gene *recA* presente em todo o gênero *Acinetobacter* spp. (425 pb). M: marcador de peso molecular 100 pb; amostras Ac 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9 e 11; CG: cepa de *Acinetobacter* spp; CN: Controle Negativo corresponde à cepa ATCC *Escherichia coli* 25922.

5.2 Determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

Todos os 100 *A. baumannii* resistentes ao imipenem e meropenem incluídos neste estudo apresentaram simultaneamente resistência à ciprofloxacina, cefotaxima, ceftazidima, cefepima e piperacilina-tazobactam. As taxas de resistência à ampicilina/sulbactam, amicacina e gentamicina foram de 61,7%, 68%, e 22%, respectivamente. Os antibióticos mais eficazes, aos quais os *A. baumannii* apresentaram as maiores taxas de sensibilidade foram a polimixina B e colistina, (98% dos isolados) e tigeciclina (88% dos isolados), como mostra a

Figura 2. A Tabela 10 mostra o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos apresentado pelos 100 *A. baumannii* incluídos neste estudo.

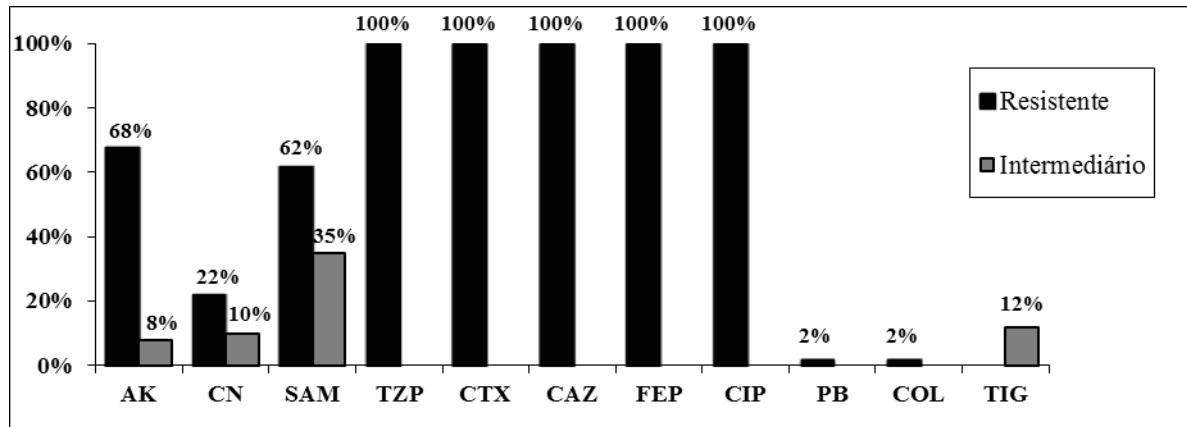


Figura 2: Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos em *Acinetobacter baumannii*. AK: Amicacina; CN: Gentamicina; SAM: Ampicilina/Sulbactam; TZP: Piperacilina/Tazobactam; CTX: Cefotaxima; CAZ: Ceftazidima; FEP: Cefepime; CIP: Ciprofloxacina; PB: Polimixina B; COL: Colistina; TIG: Tigeciclina.

Durante o período de aproximadamente seis meses, 100 *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos foram isolados de pacientes internados em UTIs do HB. Altas taxas de resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii* já foram relatadas em outras instituições, como indicam vários estudos. Llaca-Díaz e colaboradores (2012), em estudo realizado em um hospital universitário no México mostraram que de 268 *A. baumannii* isolados de pacientes internados em UTIs, 173 apresentaram resistência aos carbapenêmicos. A suscetibilidade aos carbapenêmicos declinou de 88.1% nos anos de 2001 a 2003 para menos de 25% nos anos de 2010 a 2012 no Taiwan entre os anos de 1995 e 2012 (Ku et. al., 2013), e, na Turquia, as taxas de suscetibilidade entre 2007 e 2010 decresceram de 50 para 20% para o imipenem e de 55% para 12% para o meropenem em *A. baumannii* (DEVECI et. al., 2013).

No Brasil, um estudo de vigilância (SCOPE – *Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiological Importance*) realizado em 16 hospitais envolvendo 2563 pacientes com infecção de corrente sanguínea de 2007 a 2010, mostrou que entre os *Acinetobacter* spp., mais de 50% apresentaram resistência à cefalosporinas, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e carbapenêmicos, com taxas de 55,9% para imipenem, 56,4% para meropenem, 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). Essas altas taxas de resistência apresentam alto impacto na prática clínica, pois restam poucas alternativas terapêuticas (PAUL et.al., 2010).

Todos os *A. baumannii* incluídos neste estudo são classificados como MDR (multirresistentes), de acordo com a classificação definida pelo ECDC (“*European Centre for Disease Prevention and Control*”) e CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*). O termo MDR (multirresistente) pode ser utilizado quando ocorre não-suscetibilidade a pelo menos um agente de três ou mais classes de antimicrobianos (aminoglicosídeos, carbapenêmicos, fluoroquinolonas, penicilinas associados aos inibidores de beta-lactamases, cefalosporinas de espectro-estendido, inibidores da via do folato, polimixinas e tetraciclina para *Acinetobacter* spp.). O termo XDR (extensivamente resistente) significa a não suscetibilidade a pelo menos um agente de todas ou quase todas as classes de antimicrobianos testados e o termo PDR (panresistente) é a não-suscetibilidade a todos os agentes de todas as classes de antimicrobianos da lista proposta (MAGIORAKOS et. al., 2012).

No atual estudo foram testadas sete das oito classes de antimicrobianos preconizadas para *Acinetobacter* spp., com exceção somente de inibidores da via do folato (trimetoprim-sulfametazol). O alto percentual de resistência do presente estudo é esperado, pois *A. baumannii* multirresistentes isolados de pacientes internados em UTIs tem sido frequentemente reportado em vários estudos (ALVAREZ-LERMA et. al., 2005; KATSARAGAKIS et. al., 2008; CEREDA et. al., 2011; FERREIRA et. al., 2011; GODOY, 2012; COELHO-SOUZA et. al., 2013).

Todos os isolados foram resistentes à ciprofloxacina, excluindo este antimicrobiano como opção terapêutica nas UTIs do HB. 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). Esses dados corroboram com estudos anteriores que demonstram o crescimento rápido da resistência às quinolonas entre isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii*, refletindo sua alta habilidade em adquirir mecanismos de resistência (QUALE et. al., 2003; TOGNIM et. al., 2004).

Os antimicrobianos mais ativos contra os *A. baumannii*, no atual estudo, foram gentamicina, colistina, polimixina B e tigeciclina. Resultados semelhantes foram relatados em estudos de vigilância realizados na América Latina, Ásia, Europa e América do Norte (TOGNIM et. al., 2004; GALES et.al., 2006).

Os isolados Ac01 e Ac02 apresentaram resistência à polimixina B e à colistina, antimicrobianos utilizados como última alternativa contra *A. baumannii* multirresistentes. Existem relatos de resistência à polimixina B e à colistina em *A. baumannii* em vários países

como Austrália, Tailândia, Indonésia, Índia, China, Taiwan, Cingapura, Coréia do Sul e América do Sul (HAWLEY et. al., 2008; LI et. al., 2006; YAU et. al., 2009).

Em relação à tigeciclina, 12% dos isolados apresentaram resistência intermediária, resultados semelhantes foram relatados em um estudo multicêntrico realizado por Sader e colaboradores (2013) que mostrou a diminuição da sensibilidade à tigeciclina em *A. baumannii* resistentes ao meropenem em vários continentes, sendo as taxas de 1,7% na Europa, 1,0% na América Latina e 0,3% na Ásia.

5.3 Perfil clínico-epidemiológico

Os *A. baumannii* incluídos neste estudo foram isolados de diversos espécimes clínicos: aspirado traqueal (52%), ponta de cateter (22%), urina (8%), sangue (5%), biópsia (4%), secreção (3%), líquido pleural (2%), escarro (1%), lavado bronco-alveolar (1%), líquido (1%) e medula óssea (1%) (Figura 3).

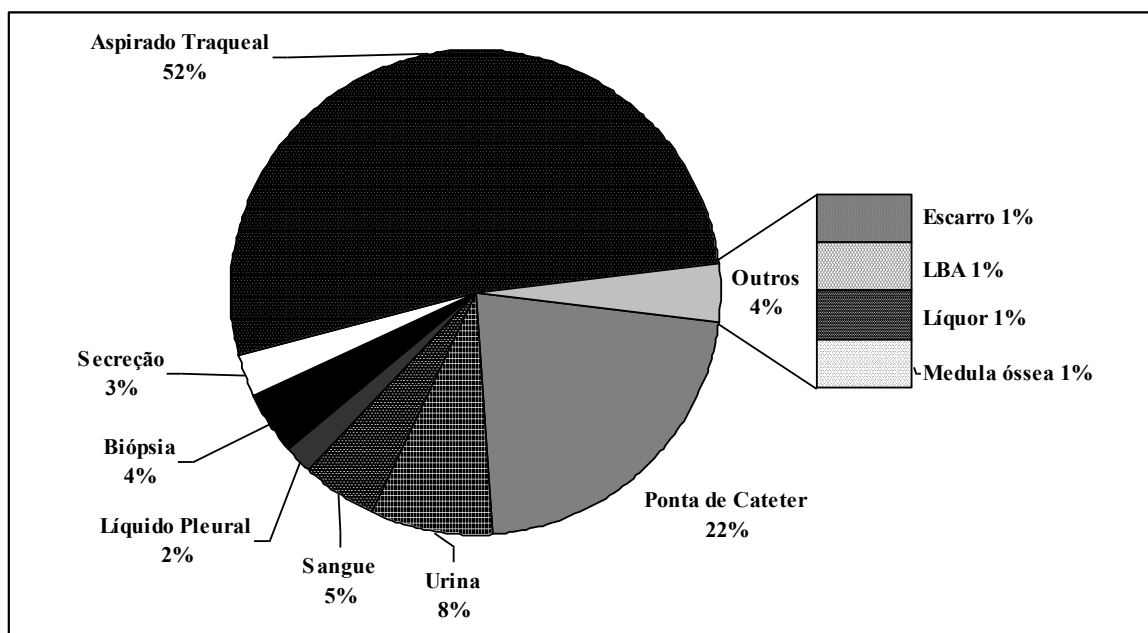


Figura 3: Distribuição dos cem espécimes clínicos obtidas de *A. baumannii*.

As amostras provenientes do trato respiratório (aspirado traqueal, lavado bronco alveolar e escarro) corresponderam a 54% das amostras coletadas, sendo o aspirado traqueal a amostra clínica mais frequente, correspondendo a 52% do total (Figura 3). *A. baumannii* é um importante agente de pneumonias associadas à ventilação mecânica (PAV), sendo provenientes de pacientes colonizados, superfícies contaminadas e fontes desconhecidas

(YONG et. al., 2007; BARCHITTA et. al., 2012). Nas UTIs, as PAV acometem até 20% dos pacientes que recebem ventilação mecânica (RODRIGUES et. al., 2009; SAFDAR et. al., 2010).

O trato respiratório dos pacientes internados nas sete UTIs do HB foi o sítio mais frequente de isolamento de *A. baumannii*. Em um grande estudo de vigilância realizado nos Estados Unidos, 5 a 10% dos casos de pneumonia adquiridas nas UTIs foram causadas por *A. baumannii* (GAYNES et. al., 2005; PELEG et. al., 2008). Porém, existem estudos onde a proporção de pacientes com PAV causados por *A. baumannii* é muito maior, demonstrando a habilidade desse micro-organismo em invadir as vias respiratórias (JANG et. al., 2009; XIA et. al., 2011; IRFAN et. al., 2011). Autores relatam a espécie *A. baumannii* como principal agente etiológico de PAV em vários países: Oriente Médio (ABDOLLAHI et. al., 2013; HAEILI et. al., 2013), China (LI et. al., 2013), Itália (SIMONETTI et. al., 2013), Arábia Saudita (EL-SAED et. al., 2013). Estudos realizados no Brasil também relatam *A. baumannii* como o agente etiológico mais isolado em PAV nas UTIs (RODRIGUES et.al., 2009; CASERTA et.al., 2012; RESENDE et. al., 2013).

O segundo espécime clínico mais frequente de isolamento de *Acinetobacter baumannii* foi ponta de cateter correspondendo a 22% (22/100) das amostras. As culturas de ponta de cateter devem ser consideradas eventos clínicos importantes e não devem ser negligenciadas, pois um dos fatores predisponentes mais importantes para o desenvolvimento de infecções da corrente sanguínea é a presença de dispositivos intravasculares como cateteres (venoso central, periféricos e arteriais) implantados no paciente (WISPLINGHOFF et. al., 2004).

Em estudo de Souli e colaboradores (2008) *A. baumannii* foi o agente mais isolado em culturas de pontas de cateter e, além disso, foi a espécie mais frequente em infecções da corrente sanguínea associadas ao cateter venoso central. Evidências na literatura médica 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 infecção da corrente sanguínea (RIJNDERS et. al., 2002; THOM et. al., 2010; ARVANITI et. al., 2012). Em estudo de vigilância SCOPE Brasileiro (*Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiological Importance*) realizado em 16 hospitais foi observado que o fator predisponente mais importante para o desenvolvimento de infecções de corrente sanguínea foi a presença de cateter venoso central (presente em 70,3% dos pacientes) e cateter venoso periférico (27,4% dos pacientes) (MARRA et. al., 2011).

Os isolados de *A. baumannii* foram coletados de pacientes internados em sete diferentes UTIs do HB, sendo a unidade com maior número de isolamentos a UTI Geral do SUS com 35 do total (35/100), seguida da UTI da Emergência (30/100), Unidade Semi-intensiva (15/100), UTI Cardiológica Adulto (10/100), UTI Geral Convênio (8/100), UTI Neonatal (1/100) e UTI Cardiológica pediátrica (1/100), como ilustrado na Figura 4.

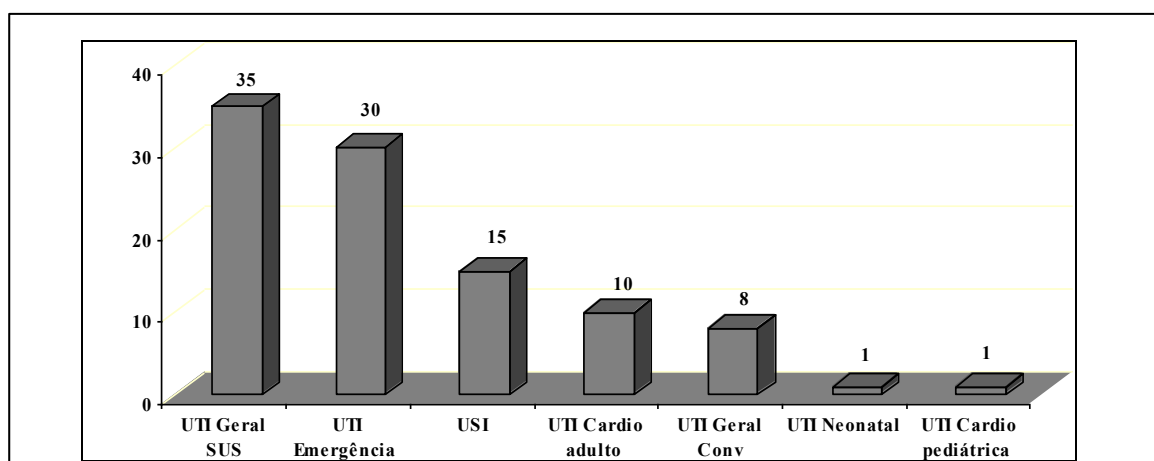


Figura 4: Distribuição dos cem pacientes presentes no estudo nas diferentes UTIs do HB.

Apenas dois isolados de *A. baumannii* foram obtidos de unidades de terapia intensiva pediátricas. Morfín-Otero e colaboradores (2013), em estudo realizado de 1999 a 2011 em um hospital terciário no México, descreveram uma taxa anual de infecções pediátricas por *A. baumannii* menor que 15% quando comparado a adultos. Pereira e colaboradores (2013) relataram uma taxa de 9,2% de infecções por *A. baumannii* entre 2563 casos de infecção de corrente sanguínea em crianças. Esses dados indicam que assim como no HB, em outros hospitais terciários do mundo, as infecções em unidades pediátricas causadas por este patógeno também são menores quando comparada às infecções em adultos.

5.4 Investigação de genes de carbapenemases

Os genes *bla*_{OXA-51like} e *bla*_{OXA-23like} foram detectados em 100% dos isolados. Seus respectivos *amplicons* foram sequenciados e as sequências obtidas comparadas ao banco de dados GenBank para a confirmação dos genes. A Figura 5 ilustra o produto amplificado pela multiplex realizada para detectar os genes *bla*_{OXA-51like}, *bla*_{OXA-23like}, *bla*_{OXA-24like} e *bla*_{OXA-58like} com tamanhos de amplicons de 501, 353, 246 e 599 pb, respectivamente.

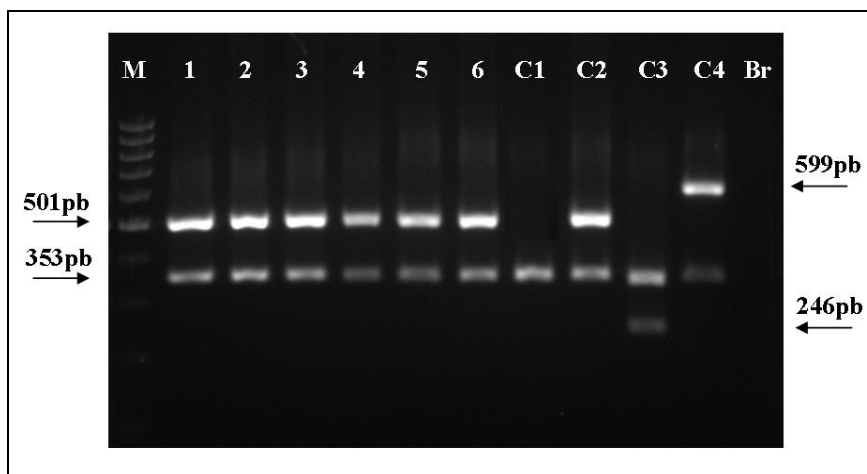


Figura 5: Eletroforese em gel de agarose mostrando o produto de amplificação dos genes *bla*_{OXA-51like} e *bla*_{OXA-23like}. M, marcador de peso molecular 100 pb; amostras AC 1, 2, 3, 4, 5, 6; C1: Controle positivo de *bla*_{OXA-51like} (353pb); C2; Controle Positivo *bla*_{OXA-23like} (501pb); C3: Controle Positivo *bla*_{OXA-24like} (246pb); C4: Controle Positivo *bla*_{OXA-58like} (599pb); BR: Controle Negativo.

Os genes *bla*_{OXA-24like}, *bla*_{OXA-58like}, *bla*_{OXA-143like}, *bla*_{OXA-48like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SPM}, *bla*_{KPC} e *bla*_{GES} não foram detectados.

A presença de *bla*_{OXA-51like} em todos os isolados incluídos neste estudo era esperada, pois o subgrupo *bla*_{OXA-51-like} é intrínseco da espécie *A. baumannii* (WALTHER-RASMUSSEN e HOIBY, 2006; BROWN et. al., 2006; WALSH, 2008).

A alta prevalência de *bla*_{OXA-23like} nos isolados do HB indica que a resistência aos carbapenêmicos possa estar sendo causada por essa carbapenemase. Este gene é intrínseco em *A. radioresistens*, mas em *A. baumannii* é adquirido, sendo usualmente localizado em plasmídeos (NEMEC, 2011). Diferente de OXA-51, OXA-23 possui atividade de carbapenemase, mas já foi demonstrado que sua expressão pode ser aumentada quando está associada a elementos de inserção como *ISAbal* (HERITIER et. al., 2005).

As carbapenemases do tipo OXA são as mais importantes causas de resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii*. Desde sua primeira detecção em 1985 na Escócia (PATON et. al., 1993), *A. baumannii* produtora de OXA-23 tem sido encontrada no mundo todo: na Alemanha (KOHLENBERG et. al., 2009), República Tcheca (SENKYRIKOVA et. al., 2013), Nigéria (OLAITAN et. al., 2013); França (BOURIGAULT et. al., 2013), região da Ásia e Pacífico (MENDES et. al., 2009; RUAN et. al., 2013), Austrália (NIGRO & HALL, 2012), Estados Unidos (ADAMS-HADUCH et. al., 2011), Canadá (MCCRACKEN et. al., 2009). Na América Latina, *A. baumannii* produtoras de OXA-23 já foram reportadas no Brasil (DALLA-COSTA et. al., 2003; MARTINS et. al., 2009; CARVALHO et. al., 2009), Argentina (MERKIER et. al., 2008; STIETZ et. al., 2013), Colômbia (VILLEGAS et. al., 2007; MARTÍNEZ e MATTAR, 2012) e Chile (GALES et. al., 2012).

As demais carbapenemases do tipo OXA (OXA-24, OXA 58, OXA-48, OXA-143), que não foram detectadas neste estudo são de baixa prevalência quando comparadas à OXA-23. Existem alguns relatos no Brasil, podemos citar OXA-58 no Sul do país (GUSATTI et. al., 2012) e no Rio de Janeiro (FIGUEIREDO et. al., 2011). Uma variante de OXA-24, chamada OXA-72 foi descrita em São Paulo (WERNECK et. al., 2011) e mais recentemente em Recife (CAVALCANTI et. al., 2013). OXA-143 foi descrita no sudeste do país (MOSTACHIO et. al., 2012; CLÍMACO et. al., 2013) e OXA-231 uma variante de OXA-143 no Paraná (GIONCO et. al., 2012).

5.5 Investigação de Sequências de Inseção do tipo IS*Aba1* associadas à *bla*_{OXA-23like} e à *bla*_{OXA-51-like}

Em 100% dos isolados foram detectados amplicons de aproximadamente 1500 pb utilizando os *primers* IS*Aba1*-F e OXA-23like-R. O produto de PCR das amostras Ac01, Ac12, Ac21, Ac25 e Ac133 foram sequenciados e foi confirmada a presença da sequência de inserção do tipo IS*Aba1* “upstream” ao gene *bla*_{OXA23-like} (Figura 6).

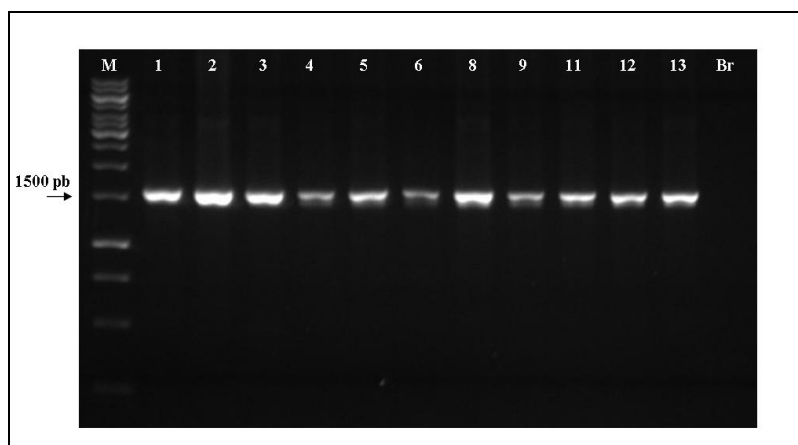


Figura 6: Eletroforese em gel de agarose mostrando o produto de amplificação da PCR de IS*Aba1*-F e OXA-23 like-R. M, marcador de peso molecular 1 kb; amostras AC 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 13, Br: Controle Negativo.

A presença *bla*_{OXA-23like} associada ao IS*Aba1* é o mais provável mecanismo de resistência aos carbapenêmicos nos *A. baumannii* do HB, pois não foi encontrado nenhum outro gene de carbapenemases. Portanto, as altas taxas de resistência ao imipenem e meropenem apresentada pelos isolados carreadores de *bla*_{OXA-23like} pode ser devido à superexpressão promovida pelo promotor presente na IS*Aba1* (TURTON et. al., 2006). Resultados semelhantes foram encontrados em estudos que também detectaram IS*Aba1*

associadas à *bla*_{OXA-23-like} em *A. baumannii* como no Rio de Janeiro e Maranhão (FONSECA et. al., 2012) e na Colômbia (MARTINEZ e MATTAR, 2012).

A associação *ISAbal-bla*_{OXA-51like} também foi investigada, mas a presença de amplicons de tamanhos diferentes e inespecíficos prejudicou o sequenciamento das amostras.

5.6 Investigação de genes de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos

Entre os sete genes de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EMAs) investigados, foram detectados quatro tipos: os genes das fosfotransferases *aph(3')-VI* e *aph(3')-Ia* e os genes das acetiltransferases *aac(6')-Ib* e *aac(3)-Ia*, distribuídos entre 89% dos isolados. Entre esses, o mais frequente foi *aph(3')-VI* (55%), seguido por *aac(6')-Ib* (46%), *aac(3)-Ia* (30%) e *aph(3')-Ia* (24%) como ilustrado na Figura 7. Os genes detectados foram confirmados por sequenciamento.

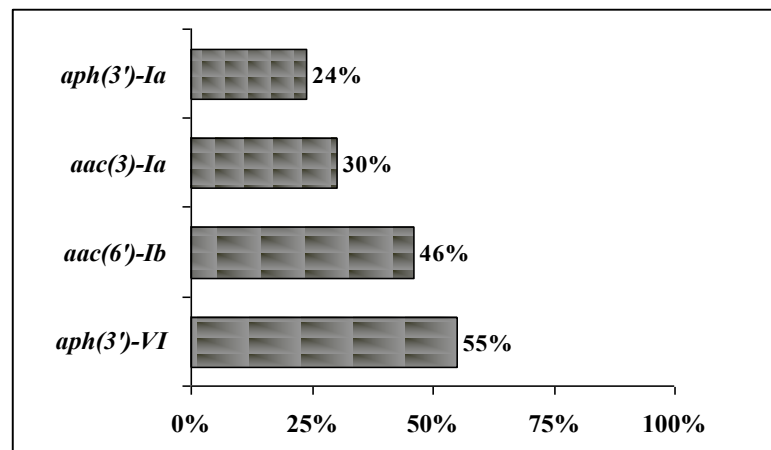


Figura 7: Porcentagem de isolados carreadores de genes de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos dos tipos *aph(3')-Ia*, *aac(3)-Ia*, *aac(6')-Ib* e *aph(3')-VI*.

A Figura 8 indica o resultado da amplificação dos genes e a Tabela 10 mostra a distribuição de genes de EMAs e seus respectivos fenótipos de susceptibilidade aos aminoglicosídeos amicacina e gentamicina. Os genes de acetiltransferases *aac(6')-Ih*, *aac(3)-IIa* e de nucleotidiltransferases *ant(2')-Ia* não foram detectados.

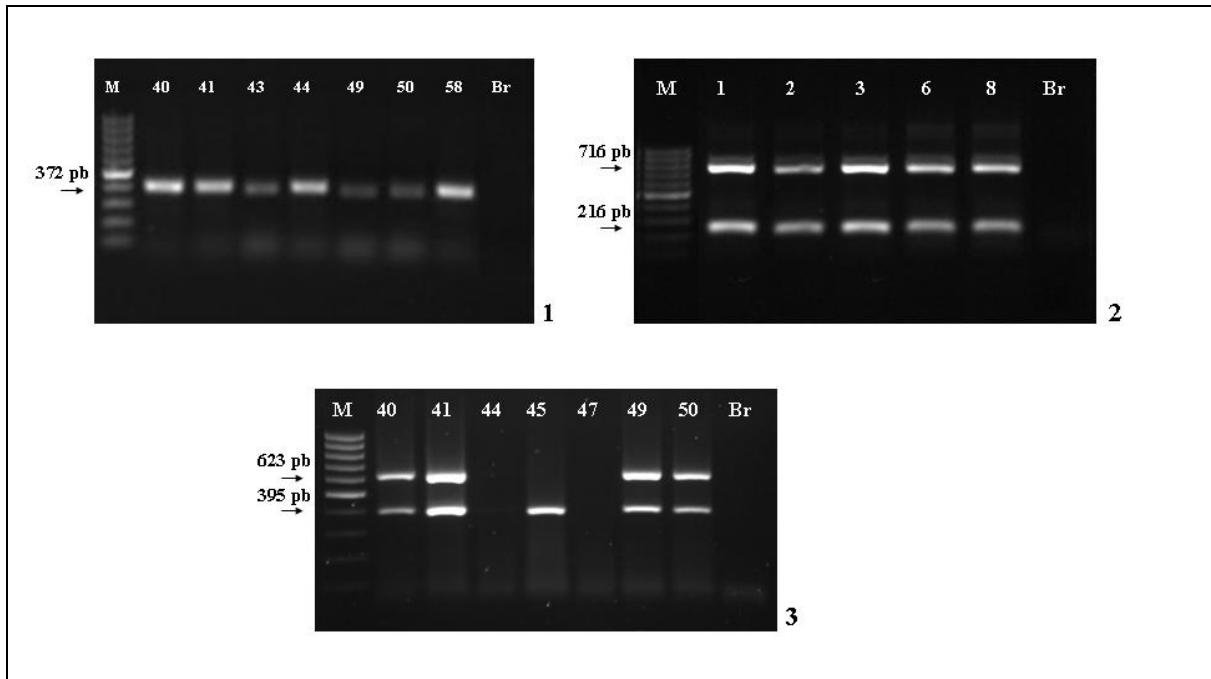


Figura 8: Eletroforese em gel de agarose mostrando os produtos de amplificação dos genes de EMAs. Gel 1: Reação Triplex 1 mostrando amostras 40, 41, 43, 44, 49, 50 e 58, carreadoras do gene *aac(3)-Ia* (372 pb). Gel 2: Reação Triplex 2 mostrando as amostras 1, 2, 3, 6 e 8 carreadoras de *aph(3')-VI* (716 pb) e positivas para o 16S rRNA (controle interno da reação 216 pb). Gel 3: Reação Duplex com amostras 40, 41, 49 e 50 carreadoras do gene *aph(3')-Ia* (623 pb) e das amostras 40, 41, 45, 49 e 50 carreadoras de *aac(6')-Ib* (395 pb). M, marcador de peso molecular 100 pb; Br: Controle Negativo.

Tabela 10: Distribuição de genes de resistência aos aminoglicosídeos e seus respectivos fenótipos de susceptibilidade.

Isolados	Fenótipo		Genes encontrados
	AK	CN	
Ac 01	R	S (<=1,0)	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 02	I	S (<=1,0)	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 03	I	S (<=1,0)	<i>aph(3')-VI</i>
Ac04	R	R (>=16)	<i>aac(6')-Ib ; aac(3)-Ia ; aph(3')-Ia</i>
Ac05	S	R (>=16)	<i>aac(6')-Ib ; aac(3)-Ia ; aph(3')-Ia</i>
Ac 06	R	S (2,0)	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 08	R	S (2,0)	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 09	R	S (2,0)	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 11	R	S (<=1,0)	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 12	R	R	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 13	S	I (8,0)	<i>aac(6')-Ib ; aac(3)-Ia ; aph(3')-Ia</i>
Ac 14	R	S (<=1,0)	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 16	S	I (8,0)	<i>aac(6')-Ib ; aac(3)-Ia ; aph(3')-Ia</i>
Ac 17	S	S	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 18	R	S (<=1,0)	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 21	R	S (<=1,0)	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 25	I	S (4,0)	<i>aac(6')-Ib ; aac(3)-Ia ; aph(3')-Ia</i>
Ac 26	R	S (4,0)	<i>aac(3')Ia; aph(3')Ia</i>
Ac 27	S	R (>=16)	<i>aac(6')-Ib ; aac(3)-Ia ; aph(3')-Ia</i>
Ac 29	R	S (<=1,0)	<i>aph(3')-VI ; aac(6')-Ib</i>
Ac 30	R	S	<i>aph(3')-VI ; aac(6')-Ib</i>
Ac 31	S	I (8,0)	<i>aac(6')-Ib ; aac(3)-Ia ; aph(3')-Ia</i>
Ac 36	R	S (<=1,0)	<i>aph(3')-VI ; aac(6')-Ib</i>
Ac 37	R	S (4,0)	<i>aph(3')-VI ; aac(6')-Ib</i>
Ac 39	R	S (<=1,0)	<i>aph(3')-VI ; aac(6')-Ib</i>
Ac 40	R	R (>=16)	<i>aac(6')-Ib ; aac(3)-Ia ; aph(3')-Ia</i>
Ac 41	R	R (>=16)	<i>aac(6')-Ib ; aac(3)-Ia ; aph(3')-Ia</i>
Ac 43	S	I (8,0)	<i>aac(3')Ia;aac(6')Ib</i>
Ac 44	R	S (<=1,0)	<i>aph(3')VI; aac(3')Ia</i>
Ac 45	R	I (8,0)	<i>aac(6')-Ib</i>
Ac 47	R	S (<=1,0)	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 48	R	S (<=1,0)	<i>aph(3')-VI ; aac(6')-Ib</i>

AK: amicacina; CN: gentamicina. I: casos em que o isolado apresentou resistência intermediária ao antimicrobiano testado.

Tabela 10 (Cont.): Distribuição de genes de resistência aos aminoglicosídeos e seus respectivos fenótipos de susceptibilidade.

Isolados	Fenótipo		Genes encontrados
	AK	CN	
Ac 49	I	I (8,0)	<i>aac(6')-Ib ; aac(3)-Ia ; aph(3')-Ia</i>
Ac 50	R	S (4,0)	<i>aac(6')-Ib ; aac(3)-Ia ; aph(3')-Ia</i>
Ac 51	R	R (>=16)	<i>aac(6')-Ib</i>
Ac 52	R	S (2,0)	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 53	R	S (2,0)	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 54	R	S (<=1,0)	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 57	R	S (<=1,0)	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 58	R	R (>=16)	<i>aac(6')-Ib ; aac(3)-Ia ; aph(3')-Ia</i>
Ac 59	R	S (<=1,0)	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 61	R	S (4,0)	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 62	R	I	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 63	R	S (<=1,0)	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 64	R	R (>=16)	<i>aac(6')-Ib ; aac(3)-Ia ; aph(3')-Ia</i>
Ac 65	R	S (<=1,0)	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 69	R	S (<=1,0)	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 70	S	S (<=1,0)	<i>aac(6')-Ib ; aac(3)-Ia ; aph(3')-Ia</i>
Ac 71	R	R (>=16)	<i>aac(6')-Ib ; aph(3')-Ia</i>
Ac 72	R	R (>=16)	<i>aac(3)-Ia ; aac(6')-Ib</i>
Ac 73	R	S (<=1,0)	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 77	R	S (4,0)	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 78	S	I (8,0)	<i>aac(6')-Ib ; aac(3)-Ia ; aph(3')-Ia</i>
Ac 81	R	R (>=16)	<i>aac(6')-Ib</i>
Ac 82	R	S (<=1,0)	<i>aph(3')-VI ; aac(6')-Ib</i>
Ac 83	R	R (>=16)	<i>aac(6')-Ib ; aac(3)-Ia ; aph(3')-Ia</i>
Ac 86	S	R (>=16)	<i>aac(6')-Ib ; aac(3)-Ia ; aph(3')-Ia</i>
Ac 93	R	S (<=1,0)	<i>aph(3')-VI ; aac(6')-Ib</i>
Ac 95	I	S (<=1,0)	<i>aph(3')-VI</i>
Ac96	R	S (<=1,0)	<i>aph(3')-VI</i>
Ac97	R	S (4,0)	<i>aph(3')-VI ; aac(6')-Ib</i>
Ac 100	R	S (2,0)	<i>aph(3')-VI ; aac(6')-Ib</i>
Ac 101	R	S (<=1,0)	<i>aac(6')-Ib</i>
Ac 105	R	S (<=1,0)	<i>aph(3')-VI</i>

AK: amicacina; CN: gentamicina. I: casos em que o isolado apresentou resistência intermediária ao antimicrobiano testado.

Tabela 10 (Cont.): Distribuição de genes de resistência aos aminoglicosídeos e seus respectivos fenótipos de susceptibilidade.

Isolados	Fenótipo		Genes encontrados
	AK	CN	
Ac 106	R	S	<i>aph(3')-VI</i> ; <i>aac(6')-Ib</i>
Ac 109	I	S ($\leq 1,0$)	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 112	R	S ($\leq 1,0$)	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 114	R	R (≥ 16)	<i>aac(6')-Ib</i> ; <i>aac(3)-Ia</i> ; <i>aph(3')-Ia</i>
Ac 115	S	S ($\leq 1,0$)	<i>aac(3)-Ia</i>
Ac 116	I	R	<i>aac(6')-Ib</i>
Ac118	R	R (≥ 16)	<i>aph(3')-VI</i> ; <i>aac(3)-Ia</i>
Ac 119	S	I (8,0)	<i>aac(3)-Ia</i> ; <i>aph(3')-Ia</i>
Ac 120	R	S (2,0)	<i>aph(3')-VI</i> ; <i>aac(6')-Ib</i>
Ac 123	R	S ($\leq 1,0$)	<i>aph(3')-VI</i> ; <i>aac(6')-Ib</i>
Ac 127	I	R	<i>aac(6')-Ib</i> ; <i>aac(3)-Ia</i> ; <i>aph(3')-Ia</i>
Ac 128	R	S (4,0)	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 130	R	S ($\leq 1,0$)	<i>aph(3')-VI</i> ; <i>aac(6')-Ib</i>
Ac 131	R	R (≥ 16)	<i>aac(6')-Ib</i> ; <i>aac(3)-Ia</i> ; <i>aph(3')-Ia</i>
Ac 133	R	S (2,0)	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 134	R	S ($\leq 1,0$)	<i>aph(3')-VI</i> ; <i>aac(6')-Ib</i>
Ac 137	R	S (4,0)	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 138	R	S (2,0)	<i>aph(3')-VI</i> ; <i>aac(6')-Ib</i>
Ac139	S	I (8,0)	<i>aac(3)-Ia</i>
Ac145	S	R (≥ 16)	<i>aac(3')-Ia</i> ; <i>aac(6')-Ib</i>
Ac 146	R	S ($\leq 1,0$)	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 147	R	S ($\leq 1,0$)	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 148	R	S	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 149	R	R (≥ 16)	<i>aac(6')-Ib</i> ; <i>aac(3)-Ia</i> ; <i>aph(3')-Ia</i>
Ac 150	R	S ($\leq 1,0$)	<i>aph(3')-VI</i> ; <i>aac(6')-Ib</i>

AK: amicacina; CN: gentamicina. I: casos em que o isolado apresentou resistência intermediária ao antimicrobiano testado.

Entre os *A. baumannii* carreadores de genes de EMAs, 48% (43/89) apresentaram apenas um gene, 28% (25/89) apresentaram dois genes e 24% (21/89) apresentaram três genes simultaneamente (Tabela 12). Os três genótipos mais encontrados foram *aph(3')-VI* encontrado em 40% (36/89) dos isolados, seguido pela associação *aac(6')-Ib*, *aac(3)-Ia* e *aph(3')-Ia* em 24% (21/89) dos isolados e pela associação *aph(3')-VI* e *aac(6')-Ib* em 19% (17/89) dos isolados.

Tabela 11: Frequência de genótipos de EMAs, sua especificidade de substratos e fenótipos de suscetibilidade aos aminoglicosídeos dos *A. baumannii* estudados.

Genótipo	N° (%) de Isolados	Substrato da Enzima	Fenótipo Encontrado	
			Amicacina (AK)	Gentamicina (CN)
<i>aph(3')-VI</i>	36	Amicacina	R (31), I (4), S (1)	R (1), I (1), S (34)
<i>aac(6')-Ib</i>	5	Amicacina	R (4), I (1)	R (3), I (1), S (1)
<i>aac(3)-Ia</i>	2	Gentamicina	S (2)	S (1), I (1)
<i>aph(3')-VI + aac(6')-Ib</i>	17	Amicacina	R (17)	S (17)
<i>aph(3')-VI + aac(3)-Ia</i>	2	Amicacina + Gentamicina	R (2)	R (1), S (1)
<i>aac(6')-Ib + aac(3)-Ia</i>	3	Amicacina + Gentamicina	R (1), S (2)	R (2) e I (1)
<i>aac(3)-Ia + aph(3')-Ia</i>	2	Gentamicina + Kanamicina	R (1), S (1)	I (1), S (1)
<i>aac(6')-Ib + aph(3')-Ia</i>	1	Amicacina + Kanamicina	R(1)	R (1)
<i>aac(6')-Ib + aac(3)-Ia + aph(3')-Ia</i>	21	Gentamicina + Amicacina	R(10), I (3), S (8)	R (13), I (5), S (3)

R: Resistente; I: Intermediário; S: Sensível; Negrito: Fenótipos concordantes com Genótipo

Na tabela 11, encontram-se destacados em negrito os fenótipos esperados de resistência aos aminoglicosídeos de acordo com os genes de resistência detectados nos isolados. A concordância entre fenótipo e genótipo de resistência foi de 83% (74/89) para a amicacina e 85% (76/89) para a gentamicina.

Os dados indicam que o gene de *aph(3')-VI*, presente em dois genótipos diferentes como único determinante de resistência à amicacina, está sendo expresso na maioria dos isolados carreadores, pois 98% (54/55) deles apresentaram resistência ou resistência intermediárias à amicacina. Apenas o isolado Ac17 apresentou sensibilidade à amicacina, achado semelhante ao de Nemec e colaboradores (2004) que entre 106 isolados de *A. baumannii* carreadores de *aph(3')-VI* apenas dois foram sensíveis à amicacina, sugerindo a não expressão desse gene nesses isolados.

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, Coréia 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. Apesar da importância da amicacina para o tratamento de infecções por *Acinetobacter baumannii* (Zhou et. al., 2010), não existem até o presente dados de estudos para a avaliação da disseminação de *aph(3')-VI* entre *A. baumannii* isolados no Brasil, sendo este, em nosso conhecimento, o primeiro relato.

A maior divergência na correlação fenótipo-genótipo foi observada entre os isolados carreadores do gene *aac(6')-Ib*. Entre os 27 isolados carreadores somente de *aac(6')-Ib* como único determinante de resistência à amicacina, 37% (10/27) apresentaram sensibilidade a este antibiótico, indicando que *aac(6')-Ib* pode não estar sendo expresso nesses isolados. Além

disso, os isolados Ac51, Ac81 e Ac116, apesar de serem carreadores somente de *aac(6')-Ib*, apresentaram resistência à gentamicina. Casin e colaboradores (2003) relataram a descoberta de uma nova variante desse gene designado como *aac(6')-Ib11*, que possui espectro estendido conferindo resistência também à gentamicina, mas, para confirmarmos essa hipótese, seria necessário o sequenciamento completo do gene. A presença de *aac(6')-Ib* em *A. baumannii* tem sido frequentemente descrita em outros países, como China com taxas de 48,7% (DAI et. al., 2010), Argélia com taxas de 4,2% (BAKOUR et. al., 2013), República Tcheca com 64% (NEMEC et. al., 2004) e Coréia do Sul com 83% (CHO et. et., 2009).

O gene *aac(3)-Ia* confere resistência à gentamicina e foi detectado em 30% (30/100) dos isolados (30/100). Na maioria das vezes foi encontrado associado a outros genes de EMAS, sendo distribuído entre isolados apresentando cinco genótipos diferentes (Tabela 11). Entre os 30 isolados carreadores de *aac(3)-Ia*, (77%) (23/30) apresentaram resistência ou resistência intermediária à gentamicina, sugerindo a expressão desse gene, e, conseqüentemente, a produção da enzima AAC(3)-Ia. Em estudo realizado por Seward e colaboradores (1998) o gene *aac(3)-Ia* foi o mais prevalente entre os genes de EMAs, com taxa de 58,9% nos *A. baumannii* isolados de vários países como Inglaterra, Itália e Austrália. Em estudos mais recentes, foram relatadas taxas de *aac(3)-Ia* de 59% na China (DAI et. al., 2010), de 15% na Coréia do Sul (CHO et. et., 2009) e de 91% na Argélia (BAKOUR et. al., 2013).

Apesar dos isolados Ac12, Ac51, Ac71, Ac81 e Ac116 terem apresentado fenótipo de resistência à gentamicina, não foram detectados genes de resistência a este antibiótico. Portanto, outros genes não testados como *aac(2')-Ib* e *aac(6')-II* e de genes de metilases *armA* e *rmtB* podem estar presentes, assim como outros mecanismos de resistência tais como bombas de efluxo AdeABC do sistema RND (RAMIREZ e TOLMASKY, 2010; MAGNET et. al., 2001; FERNÁNDEZ e HANCOCK, 2012).

O gene *aph(3')-Ia* confere resistência à kanamicina, neomicina, lividomicina, paromocina e ribostamicina (RAMIREZ e TOMALSKY, 2010) e foi detectado em 24% dos isolados, porém não pôde ser feita uma correlação entre fenótipo e genótipo, pois não foi realizado teste de sensibilidade à kanamicina devido á não utilização desse antimicrobiano no HB.

Apesar dos aminoglicosídeos permanecerem como opção no tratamento de *A. baumannii*, a alta prevalência de resistência e genes de EMAs limita a sua utilização na instituição. Além disso, esses genes estão localizados em elementos genéticos móveis, como integrons, que podem ser transferidos através de plasmídeos entre outras bactérias. E, em

muitos casos, esses integrons apresentam também os genes de carbapenemases como *bla*_{OXA-23-like}, possibilitando a disseminação de vários genes de resistência simultaneamente (NEMEC et. al., 2004; RIBERA et. al., 2004; MONIRI et. al., 2010; KARAH, 2011).

5.7 Tipagem molecular de *A. baumannii*

A tipagem molecular de *A. baumannii* foi realizada por REP-PCR, que é uma técnica frequentemente utilizada em estudos envolvendo este patógeno (ANDRIAMANANTENA et. al., 2010; RUMBO et. al., 2011; MAMMINA et. al., 2013), devido a sua boa capacidade discriminatória e facilidade de execução (BOU et. al., 2000; SAEED et.al. 2006).

A identidade genética dos 97 isolados (Ac27, Ac37 e Ac131 não foram tipáveis) foi analisada após a construção de um dendrograma de similaridade gerado pelo software Bionumerics (Applied Maths, Saint-Martens-Latem, Bélgica) (Figura 9).

O dendrograma obtido a partir da análise dos perfis migratórios dos fragmentos de DNA amplificados por REP-PCR mostrou a distribuição dos 97 isolados entre cinco grupos geneticamente distintos, denominados grupos A, B, C, D e E (Figura 9). A partir desses grupos, 20 *clusters* foram identificados utilizando-se o ponto de corte de 90% para agrupamento dos isolados no mesmo *cluster* (Figuras 12, 13, 14, 15 e 16).

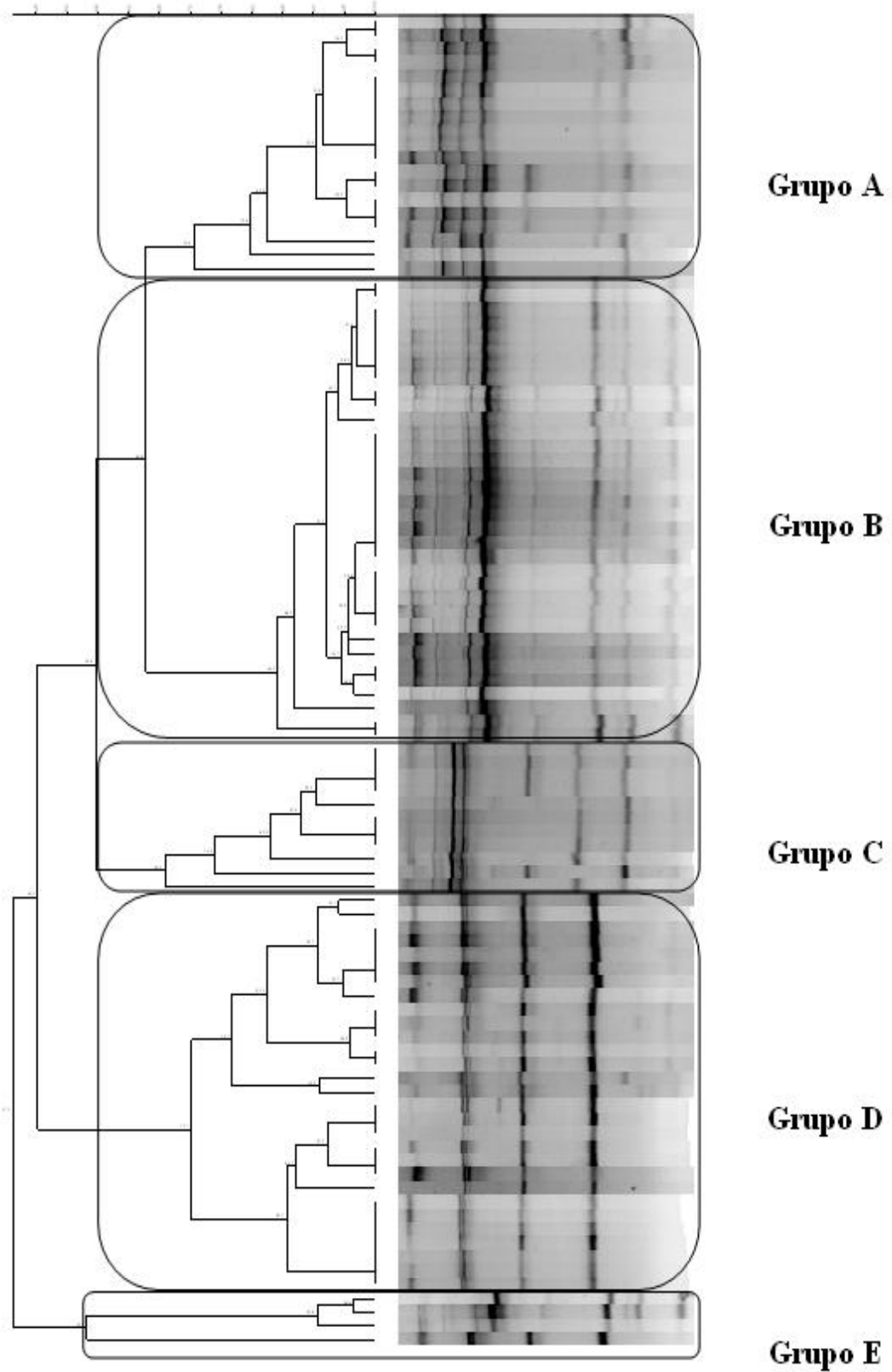


Figura 9: Dendrograma de similaridade gerado pelo software Bionumerics ilustrando a similaridade genotípica entre os isolados clínicos estudados.

O grupo A incluiu 19 isolados distribuídos em quatro *clusters* diferentes, sendo A1 o maior, contendo 16 isolados e os outros três *clusters* contendo somente um isolado (*Cluster* A2-Ac110, *Cluster* A3-Ac106 e *Cluster* A4-Ac150) (Figura 10). O primeiro (Ac20) e o último isolamento (Ac134) de *A. baumannii* do *cluster* A1 ocorreram em agosto e novembro de 2012, respectivamente, ambos de pacientes internados na UTI Geral do SUS. Entretanto, isolados do *cluster* A1 não ficaram restritos a esta UTI, sendo 50% (8/16) provenientes da UTI da Emergência, e, 31% (5/16) das UTI Geral Convênio e UTI Semi-Intensiva, em um período de três meses (Tabela 13). Esses dados sugerem a possível disseminação do *cluster* A1 de *A. baumannii* entre pacientes de diferentes UTIs do HB, resultado semelhante foi relatado por Sung e colaboradores (2011) em hospital da Coreia do Sul.

Dentro do *cluster* A1 foram encontrados isolados com diferentes genes de resistência. A associação *bla*_{OXA-51like}, *bla*_{OXA-23like} e *aph(3')-VI* foi encontrada em 42% (8/19) dos isolados; a associação *bla*_{OXA-51like}, *bla*_{OXA-23like} em 37% (7/19) e a associação *bla*_{OXA-51like}, *bla*_{OXA-23like}, *aph(3')-VI* e *aac(6')-Ib* em 21%. Foi interessante observar que dentro deste *cluster* a presença dos genes *bla*_{OXA-51like}, e *bla*_{OXA-23like} foi constante, mas os genes *aph(3')-VI* e *aac(6')-Ib* não foram detectados em todos os isolados. Além disso, entre isolados que apresentaram 100% de similaridade por REP-PCR, a distribuição de genes de EMAS não foi uniforme (Tabela 12), como nos isolados Ac21 e Ac134, provenientes de diferentes UTIs com três meses de diferença, e que diferiram entre si pela ausência de *aac(6')-Ib* em Ac134. Situação semelhante foi observada quando comparamos os isolados Ac20 e Ac69, também isolados de pacientes admitidos em diferentes UTIs, com dois meses de intervalo. Neste caso, Ac69 apresentou *aph(3')-VI*, não detectado em Ac20. Considerando que genes de EMAS são localizados em elementos genéticos móveis altamente transferíveis (ÇİÇEK et. al., 2013), é possível que diferentes genes tenham sido adquiridos pelos isolados em diferentes períodos, e selecionados de acordo com a pressão exercida pelo uso destes antimicrobianos em cada UTI (Cho et. al., 2009). Dados semelhantes foram previamente descritos por outros autores que também não encontraram correlação entre isolados com alta similaridade genética serem carreadores dos mesmos genes de resistência (MAMMINA et. al., 2012; AGHAZADEH et. al., 2013).

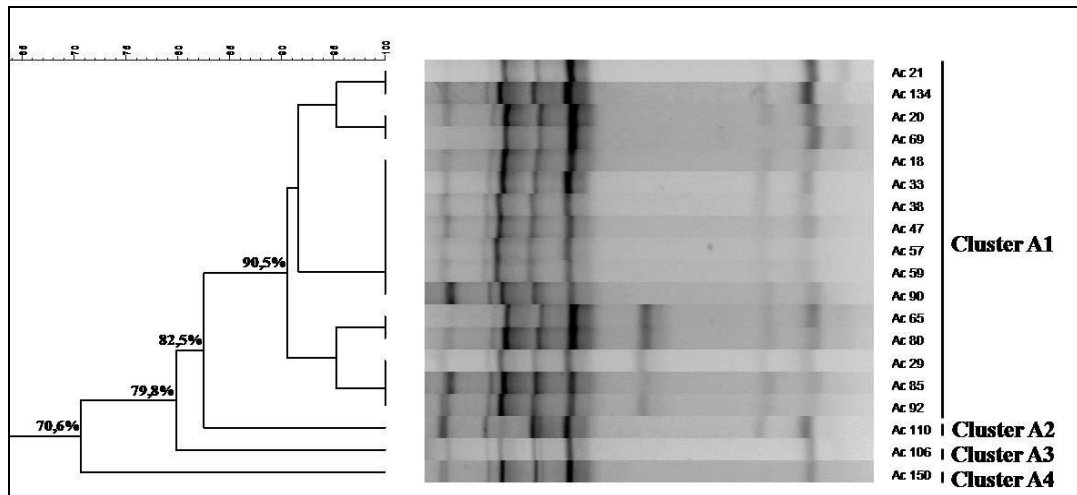


Figura 10: Dendrograma mostrando o grupo A e seus quatro clusters A1, A2, A3 e A4.

Tabela 12: Distribuição de *A. baumannii* do grupo A nas UTIs com respectivas datas de isolamento, genótipo e clusters a que pertencem.

Isolado	Unidade de Internação	Data	Genótipo	Cluster REP
Ac 18	UTI Emergência	20/8/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aph(3')-VI</i>	A1
Ac 20	UTI Geral SUS	18/8/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	A1
Ac 21	UTI Emergência	20/8/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aph(3')-VI</i>	A1
Ac29	UTI Emergência	21/8/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aph(3')-VI</i> , <i>aac(6')-Ib</i>	A1
Ac 33	UTI Geral SUS	22/8/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	A1
Ac 38	UTI Geral Conv	27/8/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	A1
Ac 47	UTI Emergência	4/9/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aph(3')-VI</i>	A1
Ac57	UTI Semi-Intensiva	13/9/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aph(3')-VI</i>	A1
Ac59	UTI Semi-Intensiva	13/9/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aph(3')-VI</i>	A1
Ac65	UTI Semi-Intensiva	14/9/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aph(3')-VI</i>	A1
Ac 69	UTI Emergência	2/10/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aph(3')-VI</i>	A1
Ac80	UTI Emergência	2/10/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	A1
Ac85	UTI Emergência	8/10/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	A1
Ac90	UTI Semi-Intensiva	9/10/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	A1
Ac92	UTI Emergência	8/10/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	A1
Ac 134	UTI Geral SUS	29/11/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aph(3')-VI</i> , <i>aac(6')-Ib</i>	A1
Ac110	UTI Geral SUS	22/10/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	A2
Ac106	UTI Emergência	24/10/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aph(3')-VI</i> , <i>aac(6')-Ib</i>	A3
Ac150	UTI Geral SUS	10/12/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aph(3')-VI</i> , <i>aac(6')-Ib</i>	A4

O grupo B apresentou 34 isolados distribuídos em três *clusters*: B1 contendo 31 isolados, B2 contendo um isolado (Ac82) e B3 (Ac147 e Ac148) contendo dois isolados (Figura 11). Isolados pertencentes ao *cluster* B1 foram encontrados durante todo o período de coleta, de julho (Ac01) a dezembro (Ac146), indicando endemicidade desse *cluster* na instituição.

Além disso, foram encontrados indícios de transmissão horizontal deste *cluster*, por exemplo, os isolados Ac01 e Ac02, que, apesar de terem sido provenientes de pacientes admitidos em dias e UTIs diferentes, apresentaram 100% de similaridade genética, mesmo fenótipo de resistência aos antimicrobianos e os mesmos genes de resistência [*bla*_{OXA-51like}, *bla*_{OXA-23like}, *aph(3')*-VI], evidenciando disseminação horizontal em unidades de internação situadas em andares distintos. A disseminação horizontal de *A. baumannii* em hospitais já foi relatada por vários autores (DALLA-COSTA et. al., 2003; van den BROEK et. al., 2009; SUNG et. al., 2012; MAMMINA et.al., 2012).

O genótipo predominante no *cluster* B1 foi *bla*_{OXA-51like}, *bla*_{OXA-23like}, *aph(3')*-VI, sendo encontrado em 59% (20/34) dos isolados. Os *clusters* do grupo B foram isolados de todas as UTIs do HB (exceto UTIs Cardiológicas) e em todo o período estudado, e o *cluster* B1 foi o único do grupo B a ser isolado ao longo dos quatro meses de coleta (02/07 a 07/12) indicando ser um *cluster* endêmico dentro do HB (Tabela 13).

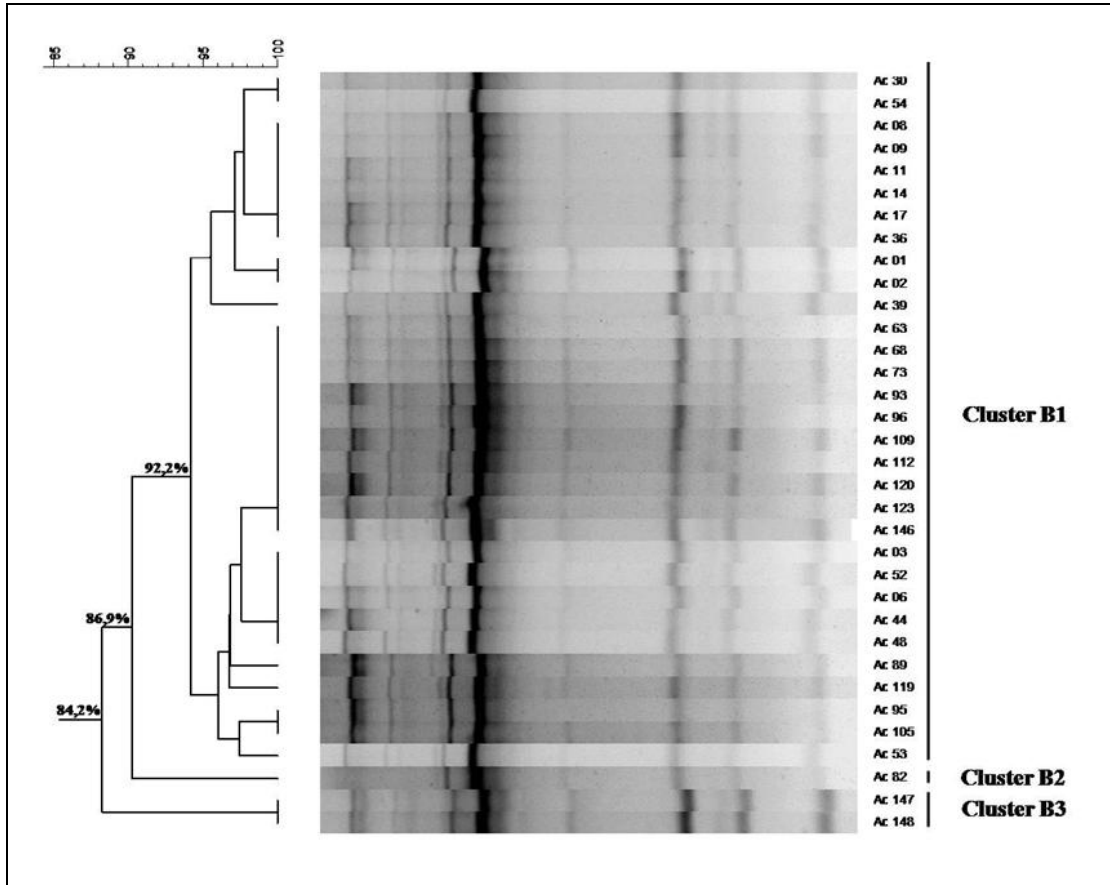


Figura 11: Dendrograma mostrando o grupo B e seus três *clusters* B1, B2 e B3.

Tabela 13: Distribuição de *A. baumannii* do grupo B nas UTIs com respectivas datas de isolamento, genótipo e clusters a que pertencem.

Isolado	Unidade de Internação	Data	Genótipo	Cluster REP
Ac01	UTI Cardio pediátrica	2/7/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aph(3')-VI</i>	B1
Ac02	UTI Geral Conv	14/7/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aph(3')-VI</i>	B1
Ac03	UTI Emergência	31/7/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aph(3')-VI</i>	B1
Ac06	UTI Semi-Intensiva	31/7/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aph(3')-VI</i>	B1
Ac8	UTI Geral SUS	5/8/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aph(3')-VI</i>	B1
Ac9	UTI Geral SUS	6/8/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aph(3')-VI</i>	B1
Ac11	UTI Semi-Intensiva	6/8/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aph(3')-VI</i>	B1
Ac14	UTI Emergência	12/8/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aph(3')-VI</i>	B1
Ac17	UTI Emergência	13/8/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aph(3')-VI</i>	B1
Ac30	UTI Geral SUS	24/8/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aph(3')-VI</i> , <i>aac(6')-Ib</i>	B1
Ac36	UTI Geral SUS	24/8/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aph(3')-VI</i> , <i>aac(6')-Ib</i>	B1
Ac39	UTI Emergência	27/8/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aph(3')-VI</i> , <i>aac(6')-Ib</i>	B1
Ac44	UTI Geral SUS	1/9/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aph(3')-VI</i> , <i>aac(6')-Ib</i>	B1
Ac48	UTI Geral SUS	7/9/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aph(3')-VI</i> , <i>aac(6')-Ib</i>	B1
Ac52	UTI Geral SUS	10/9/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aph(3')-VI</i>	B1
Ac53	UTI Cardio Adulto	10/9/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aph(3')-VI</i>	B1
Ac54	UTI Geral SUS	12/9/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aph(3')-VI</i>	B1
Ac63	UTI Geral SUS	16/9/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aph(3')-VI</i>	B1
Ac68	UTI Emergência	19/9/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	B1
Ac73	UTI Cardio Adulto	26/9/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aph(3')-VI</i>	B1
Ac89	UTI Cardio Adulto	8/10/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	B1
Ac93	UTI Geral Conv	8/10/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aph(3')-VI</i> , <i>aac(6')-Ib</i>	B1
Ac95	UTI Semi-Intensiva	12/10/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aph(3')-VI</i>	B1
Ac96	UTI Geral SUS	12/10/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aph(3')-VI</i>	B1
Ac105	UTI Geral SUS	18/10/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aph(3')-VI</i>	B1
Ac109	UTI Emergência	22/10/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aph(3')-VI</i>	B1
Ac112	UTI Cardio Adulto	24/10/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aph(3')-VI</i>	B1
Ac119	UTI Geral SUS	6/11/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aac(3)-Ia</i> , <i>aph(3')-Ia</i>	B1
Ac120	UTI Geral Conv	5/11/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aph(3')-VI</i> , <i>aac(6')-Ib</i>	B1
Ac123	UTI Geral SUS	3/11/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aph(3')-VI</i> , <i>aac(6')-Ib</i>	B1
Ac146	UTI Geral Conv	7/12/2011	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aph(3')-VI</i>	B1
Ac82	UTI Geral SUS	3/10/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aph(3')-VI</i> , <i>aac(6')-Ib</i>	B2
Ac147	UTI Semi-Intensiva	6/12/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aph(3')-VI</i>	B3
Ac148	UTI Geral SUS	8/12/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aph(3')-VI</i>	B3

O grupo C incluiu cinco *clusters*, *cluster* C1 com cinco isolados, *cluster* C2 com três isolados e os *clusters* C3 (Ac137), C4 (Ac128) e C5 (Ac115) com um isolado cada (Figura 12). Os isolados Ac97 e Ac100, com similaridade genética de 100%, apresentaram o mesmo genótipo [*bla*_{OXA-51like}, *bla*_{OXA-23like}, *aac*(6')-Ih, *aph*(3')-VI] e ambas foram isoladas da UTI Cardiológica de Adultos, com apenas oito dias de diferença, evidenciando a ocorrência de transmissão horizontal dentro desta UTI (Tabela 14).

O primeiro isolamento do *cluster* C1 (Ac12) ocorreu na UTI Semi-Intensiva, após 12 dias, outro representante de C1 (Ac26) foi isolado na UTI da Emergência, e, após um mês, foram isolados três representantes deste *cluster* na UTI Geral (Ac61, Ac62 e Ac77) demonstrando a circulação do mesmo *cluster* em diferentes UTIs e em períodos de tempo distintos (Tabela 14).

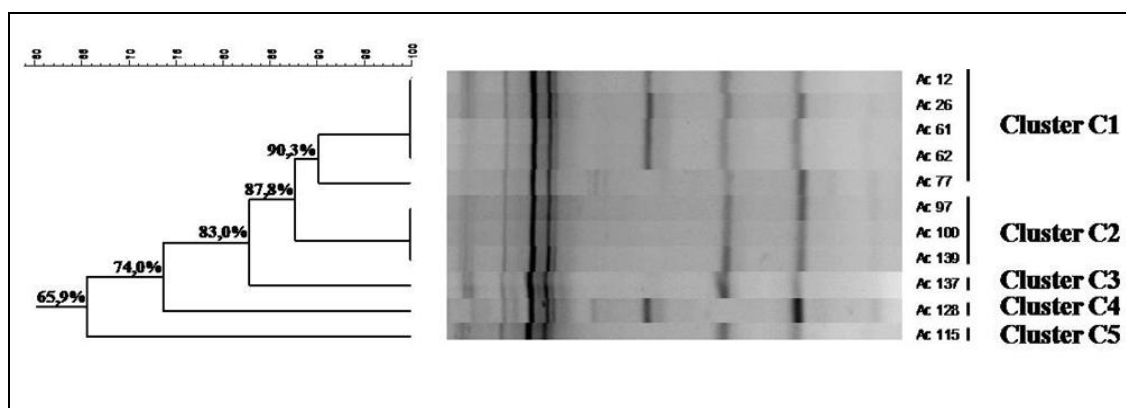


Figura 12: Dendrograma mostrando o grupo C e seus cinco *clusters* C1, C2 e C3.

Tabela 14: Distribuição de *A. baumannii* do grupo C nas UTIs com respectivas datas de isolamento, genótipo e *clusters* a que pertencem.

Isolado	Unidade de Internação	Data	Genótipo	Cluster REP
Ac12	UTI Semi-Intensiva	7/8/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aph</i> (3')-VI	C1
Ac26	UTI Emergência	19/8/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aac</i> (3)-Ia; <i>aph</i> (3')-Ia	C1
Ac61	UTI Geral SUS	15/9/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aph</i> (3')-VI	C1
Ac62	UTI Geral SUS	19/9/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aph</i> (3')-VI	C1
Ac77	UTI Geral SUS	1/10/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aph</i> (3')-VI	C1
Ac97	UTI Cardio Adulto	13/10/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aph</i> (3')-VI, <i>aac</i> (6')-Ib	C2
Ac100	UTI Cardio Adulto	21/10/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aph</i> (3')-VI, <i>aac</i> (6')-Ib	C2
Ac139	UTI Semi-Intensiva	30/11/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aac</i> (3)-Ia	C2
Ac137	UTI Cardio Adulto	19/11/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aph</i> (3')-VI	C3
Ac128	UTI Cardio Adulto	25/11/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aph</i> (3')-VI	C4
Ac115	UTI Emergência	28/10/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aac</i> (3)-Ia	C5

O grupo D compreendeu 29 isolados divididos em seis *clusters*: D1 (oito isolados), D2 (cinco isolados), D3 (dois isolados), D4 (seis isolados), D5 (um isolado) e D6 (sete isolados) (Figura 13). Dos oito isolados do *cluster* D1, cinco foram provenientes da UTI da Emergência em todo o período de coleta, dois foram recuperados da UTI Geral do SUS e um da UTI Semi-Intensiva (Tabela 15). O genótipo *bla*_{OXA-51like}, *bla*_{OXA-23like}, *aac*(6')-Ib; *aac*(3)-Ia; *aph*(3')-Ia foi observado inicialmente em isolados do grupo D, sendo predominante no *cluster* D1, presente em 75% (6/8) dos isolados.

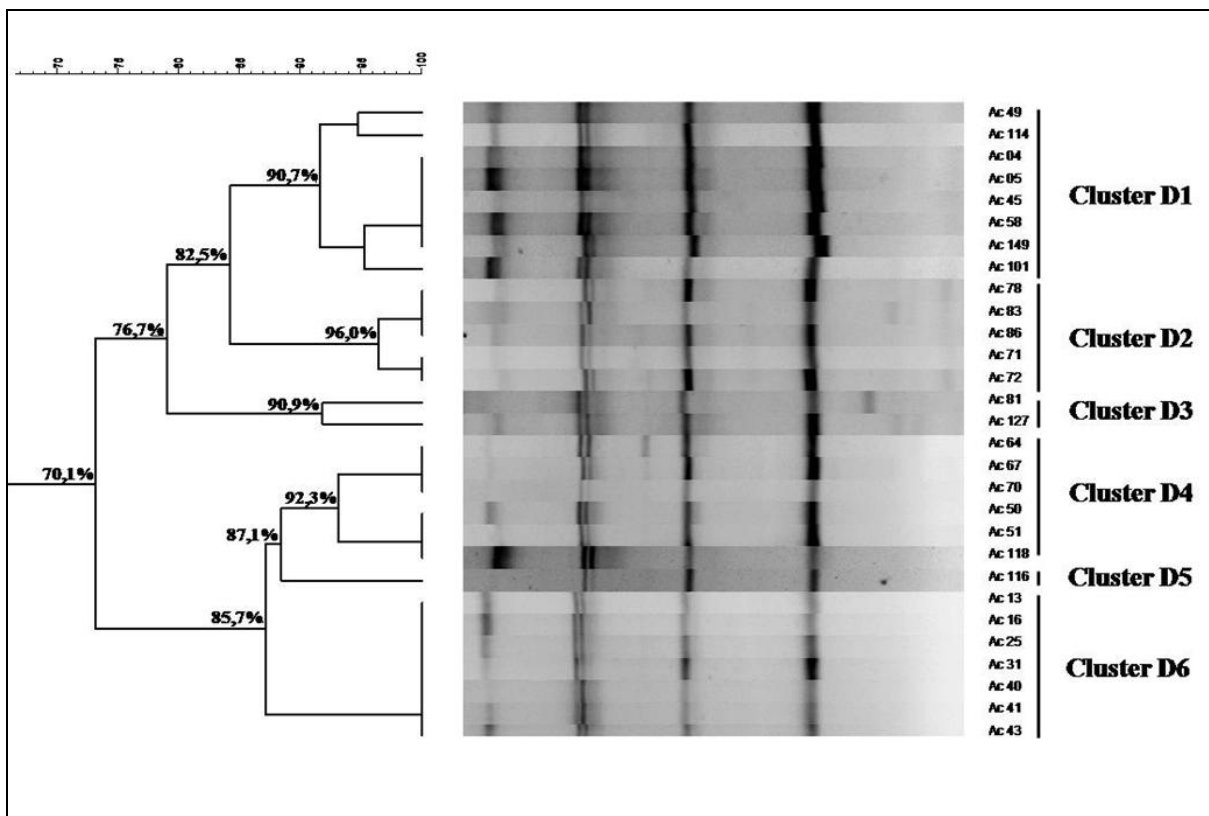


Figura 13: Dendrograma mostrando o grupo D e seus seis *clusters* D1, D2, D3, D4, D5 e D6.

Os isolados Ac78, Ac86 e Ac83 do *cluster* D2 foram recuperados nos dias 03, 05 e 18 de outubro, respectivamente, sendo Ac78 e Ac86 da UTIs Geral SUS e Ac83 da UTI Geral do Convênio. A similaridade entre eles foi de 100% e, além disso, apresentaram o mesmo genótipo [*bla*_{OXA-51like}, *bla*_{OXA-23like}, *aaac*(6')-Ib; *aac*(3)-Ia; *aph*(3')-Ia], mostrando a presença de clones circulando em curto período de tempo na mesma UTI, sugerindo disseminação horizontal.

Todos os isolados do *cluster* D6 apresentaram 100% de similaridade, quatro desses (Ac13, Ac16, Ac31, Ac40) foram provenientes da UTI Geral do SUS, um (Ac25) da UTI Semi-Intensiva e dois (Ac41 e Ac43) da UTI da Emergência. Existem evidências de uma

possível rota de disseminação desse *cluster* entre as UTIs, pois seu primeiro isolamento ocorreu na UTI Geral do SUS no dia 10/08, após sete dias se disseminou para a UTI Semi-Intensiva e após um mês chegou à UTI da Emergência, além disso, seis dos sete isolados do *cluster* D6 possuíam o mesmo genótipo [*bla*_{OXA-51like}, *bla*_{OXA-23like}, *aac*(6')-Ib, *aac*(3)-Ia, *aph*(3')-Ia], com exceção de Ac43 que apresentou genótipo similar [*bla*_{OXA-51like}, *bla*_{OXA-23like}, *aac*(6')-Ib, *aac*(3)-Ia], com ausência apenas de *aph*(3')-Ia.

A análise genotípica dos grupos e *clusters* mostrou a ocorrência de genótipos mais frequentes em distintos grupos, por exemplo, o genótipo [*bla*_{OXA-51like}, *bla*_{OXA-23like}, *aac*(6')-Ib, *aac*(3)-Ia, *aph*(3')-Ia] foi detectado somente em isolados do grupo D. Assim como no grupo B, os *clusters* do grupo D foram isolados de todas as UTIs do HB (exceto UTI Cardiologia Pediátrica).

Tabela 15: Distribuição de *A. baumannii* do grupo D nas UTIs com respectivas datas de isolamento, genótipo e *clusters* a que pertencem.

Isolado	Unidade de Internação	Data	Genótipo	Cluster
Ac4	UTI Emergência	2/8/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aac</i> (6')-Ib; <i>aac</i> (3)-Ia; <i>aph</i> (3')-Ia	D1
Ac5	UTI Geral SUS	3/8/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aac</i> (6')-Ib; <i>aac</i> (3)-Ia; <i>aph</i> (3')-Ia	D1
Ac45	UTI Emergência	18/9/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aac</i> (6')-Ib	D1
Ac49	UTI Geral SUS	9/9/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aac</i> (6')-Ib; <i>aac</i> (3)-Ia; <i>aph</i> (3')-Ia	D1
Ac58	UTI Emergência	13/9/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aac</i> (6')-Ib; <i>aac</i> (3)-Ia; <i>aph</i> (3')-Ia	D1
Ac101	UTI Semi-Intensiva	9/11/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aac</i> (6')-Ib	D1
Ac114	UTI Emergência	25/10/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aac</i> (6')-Ib; <i>aac</i> (3)-Ia; <i>aph</i> (3')-Ia	D1
Ac149	UTI Emergência	3/12/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aac</i> (6')-Ib; <i>aac</i> (3)-Ia; <i>aph</i> (3')-Ia	D1
Ac71	UTI Cardio Adulto	20/9/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aac</i> (6')-Ib, <i>aph</i> (3')-Ia	D2
Ac72	UTI Emergência	20/9/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aac</i> (3)-Ia; <i>aac</i> (6')-Ib	D2
Ac78	UTI Geral SUS	3/10/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aac</i> (6')-Ib; <i>aac</i> (3)-Ia; <i>aph</i> (3')-Ia	D2
Ac83	UTI Geral SUS	5/10/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aac</i> (6')-Ib; <i>aac</i> (3)-Ia; <i>aph</i> (3')-Ia	D2
Ac86	UTI Geral Conv	18/10/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aac</i> (6')-Ib; <i>aac</i> (3)-Ia; <i>aph</i> (3')-Ia	D2
Ac81	UTI Geral SUS	6/10/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aac</i> (6')-Ib	D3
Ac127	UTI Geral SUS	23/11/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aac</i> (6')-Ib; <i>aac</i> (3)-Ia; <i>aph</i> (3')-Ia	D3
Ac50	UTI Geral SUS	9/9/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aac</i> (6')-Ib; <i>aac</i> (3)-Ia; <i>aph</i> (3')-Ia	D4
Ac51	UTI Geral Conv	7/9/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aac</i> (6')-Ib	D4
Ac64	UTI Semi-Intensiva	17/9/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aac</i> (6')-Ib; <i>aac</i> (3)-Ia; <i>aph</i> (3')-Ia	D4
Ac67	UTI Emergência	18/9/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	D4
Ac70	UTI Emergência	17/9/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aac</i> (6')-Ib; <i>aac</i> (3)-Ia; <i>aph</i> (3')-Ia	D4
Ac118	UTI Semi-Intensiva	20/11/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aph</i> (3')-VI, <i>aac</i> (6')-Ib	D4
Ac116	UTI Semi-Intensiva	2/11/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aac</i> (6')-Ib	D5
Ac13	UTI Geral SUS	10/8/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aac</i> (6')-Ib; <i>aac</i> (3)-Ia; <i>aph</i> (3')-Ia	D6
Ac16	UTI Geral SUS	10/8/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aac</i> (6')-Ib; <i>aac</i> (3)-Ia; <i>aph</i> (3')-Ia	D6
Ac25	UTI Semi-Intensiva	17/8/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aac</i> (6')-Ib; <i>aac</i> (3)-Ia; <i>aph</i> (3')-Ia	D6
Ac31	UTI Geral SUS	23/8/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aac</i> (6')-Ib; <i>aac</i> (3)-Ia; <i>aph</i> (3')-Ia	D6
Ac40	UTI Geral SUS	27/8/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aac</i> (6')-Ib; <i>aac</i> (3)-Ia; <i>aph</i> (3')-Ia	D6
Ac41	UTI Emergência	2/9/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aac</i> (6')-Ib; <i>aac</i> (3)-Ia; <i>aph</i> (3')-Ia	D6
Ac43	UTI Emergência	5/9/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aac</i> (3)-Ia; <i>aac</i> (6')-Ib	D6

O grupo E apresentou quatro isolados distribuídos em dois *clusters*; E1 e E2 (Figura 14). O primeiro isolamento do *cluster* E1 (Ac133) ocorreu em novembro de 2012 na UTI da Emergência e, após três dias, esse *cluster* foi encontrado na UTI Geral do SUS (Ac130 e Ac138) (Tabela 16). Este grupo apresentou o menor número de isolados e foi detectado somente no final do período de coleta, dado que indica a provável introdução *A. baumannii* geneticamente distintos no ambiente hospitalar. A cepa Ac145, única do *cluster* E2, foi isolada em no começo do mês de dezembro, e, provavelmente, se as coletas tivessem continuado, o *cluster* possuiria maior número de isolados.

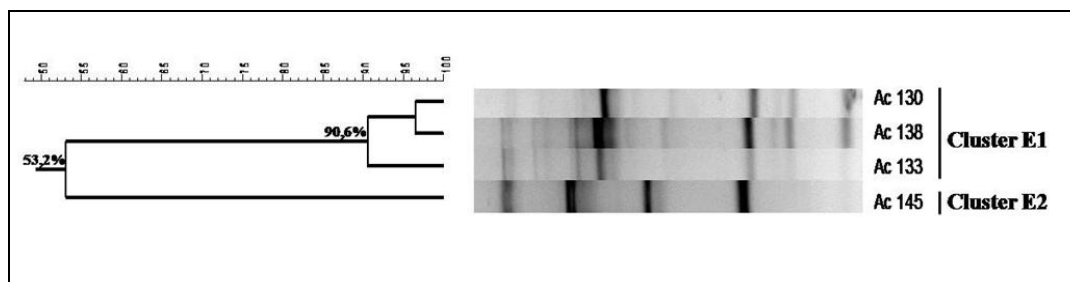


Figura 14: Dendrograma mostrando o grupo E e seus dois *clusters* E1 e E2.

Tabela 16: Distribuição de *A. baumannii* do grupo E nas UTIs com respectivas datas de isolamento, genótipo e *clusters* a que pertencem.

Isolado	Unidade de Internação	Data	Genótipo	Cluster
Ac130	UTI Geral SUS	2/12/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aph(3')-VI</i> , <i>aac(6')-Ib</i>	E1
Ac133	UTI Emergência	29/11/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aph(3')-VI</i>	E1
Ac138	UTI Geral SUS	2/12/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aph(3')-VI</i> , <i>aac(6')-Ib</i>	E1
Ac145	UTI Emergência	5/12/2012	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like} , <i>aac(3)-Ia</i> ; <i>aac(6')-Ib</i>	E2

A análise dos grupos e *clusters* de *A. baumannii* circulantes no HB mostra que existem clones endêmicos no hospital. É possível que a forte pressão seletiva exercida pela utilização de antimicrobianos para o tratamento das infecções nos pacientes admitidos na UTIs tenha selecionado carreadores de genes adquiridos por transmissão horizontal. A presença de diferentes combinações de genes *bla* e de EMAs em *A. baumannii* com diferentes perfis genotípicos, isoladas em diferentes ambientes e em períodos distintos sugere a mobilização constante destes genes, causada pela integração ou perda de novos genes de resistência através de plasmídeos (DOMINGUES et. al., 2012; LIN et. al., 2013).

Também existem evidências de disseminação horizontal de *A. baumannii* na instituição, aumentando a necessidade de adoção de medidas de precaução apropriadas (LEE et. al., 2012; 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).

Conclusões

6. CONCLUSÕES

- Os isolados estudados apresentaram altas taxas de resistência às cefalosporinas de terceira geração, carbapenêmicos, fluoroquinolonas e ao aminoglicosídeoamicacina. Os antibióticos mais ativos contra *A. baumannii* foram tigeciclina, colistina, polimixina B e gentamicina.
- Todos isolados foram pertencentes à espécie *Acinetobacter baumannii*.
- Os genes de MBLs (*bla*_{IMP}, *bla*_{SPM} e *bla*_{VIM}), de carbapenemases da classe A (*bla*_{KPC} e *bla*_{GES}) e das CHDLs (*bla*_{OXA-24like}, *bla*_{OXA-58like}, *bla*_{OXA-143like} e *bla*_{OXA-48like}) não foram detectados.
- Os genes de CHDLs, *bla*_{OXA51-like} e *bla*_{OXA23-like} foram detectados em 100% dos isolados.
- A sequência de inserção *ISAbal* esteve associada somente a *bla*_{OXA-23-like}, sendo detectada em 100% dos isolados.
- Dentre os genes de EMAs, *aph(3')-VI* foi detectado em 55% dos isolados, *aac(6')-Ib* em 46% dos isolados, *aac(3)-Ia* em 30% dos isolados e *aph(3')-Ia* em 24% dos isolados. Os demais genes investigados [*aac(6')-Ih*, *aac(3)-IIa* e *ant(2')Ia*] não foram detectados.
- Pelo método de REP-PCR, foram identificados 20 clusters de *A. baumannii* no HB. A análise da tipagem mostrou que isolados de um mesmo *cluster* foram recuperados em todo o período do estudo e em UTIs distintas, sugerindo a existência de clones endêmicos no HB.

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDOLLAHI, A.; SHOAR, S.; SHOAR, N. Microorganisms colonization and their antibiotic resistance pattern in oro-tracheal tube. **Iran J Microbiol.** v.5, n.2, p.102-107, 2013.
- ADAMS-HADUCH, J.M.; ONUOHA, E.O.; BOGDANOVICH, T.; TIAN, G.B.; MARSCHALL, J.; URBAN, C.M.; SPELLBERG, B.J.; RHEE, D.; HALSTEAD, D.C.; PASCULLE, A.W.; DOI, Y. Molecular epidemiology of carbapenem nonsusceptible *Acinetobacter baumannii* in the United States. **J Clin Microbiol.** v.49, p.3849-3854, 2011.
- ADNAN, S.; PATERSON, D.L.; LIPMAN, J.; ROBERTS, J.A. Ampicillin/sulbactam: Its potential use in treating infections in critically ill patients. **Int J Antimicrob Agents,** v.42, p. 384-389, 2013.
- AFZAL-SHAH, M.; Woodford, N.; Livermore, D.M. Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D beta-lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother.** v.45, n.2, p.583-588, 2001.
- AGHAZADEH, M.; REZAEI, M.A.; NAHAEI, M.R.; MAHDIAN, R.; PAJAND, O.; SAFFARI, F.; HASSAN, M.; HOJABRI, Z. Dissemination of Aminoglycoside-Modifying Enzymes and 16S rRNA Methylases Among *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* Isolates. **Microbial Drug Resistance.** v.19, n.4, p. 282-288. 2013.
- ALMEIDA, L.A.; ARAUJO, R. Highlights on molecular identification of closely related species. **Infect Genet Evol.** v.13, p. 67-75, 2013.
- AL MOHAJER M, DAROUICHE RO. Sepsis syndrome, bloodstream infections, and device-related infections. **Med Clin North Am.** v.96, n.6, p.1203-23, 2012.
- ALVAREZ-LERMA, F.; PALOMAR, M.; INSAUSTI, J.; OLAECHEA, P.; CERDÁ, E.; CASTILLO, F.; MARTÍNEZ-PELLÚS, A. Grupo de Estudio Nacional de Vigilancia de Infección Nosocomialen UCI Infections caused by *Acinetobacter* spp. in critically ill ICU patients. **Enferm Infecc Microbiol Clin.** v.23, n.9, p.533-539, 2005.
- AKERS, K.S.; CHANEY, C.; BARSOUMIAN, A.; BECKIUS, M.; ZERA, W.; YU, X.; GUYMON, C.; KEEN, E.F.; ROBINSON, B.J.; MENDE, K.; MURRAY, C.K. Aminoglycoside resistance and susceptibility testing errors in *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex. **J Clin Microbiol.** v.48, n.4, p.1132-1138, 2010.
- AMBLER, R.P. The structure of Beta-lactamases. **Philos Trans R Soc Lond.** v.289, p.321-331, 1980.
- ANDRIAMANANTENA, T.S.; RATSIMA, E.; RAKOTONIRINA, H.C.; RANDRIANIRINA, F.; RAMPARANY, L.; CAROD, J.F.; RICHARD, V.; TALARMIN, A. Dissemination of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* in various hospitals of Antananarivo Madagascar. **Ann Clin Microbiol Antimicrob.** v.9, n.17, p.2-6, 2010.

- ANTUNES, L.C.; VISCA, P.; TOWNER, K.J. *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. **Pathog Dis**. 2013.
- ARVANITI, K.; LATHYRIS, D.; CLOUVA-MOLYVDAS, P.; HAIDICH, A.B.; MOULOUDI, E.; SYNNEFAKI, E.; KOULOURIDA, V.; GEORGOPOULOS, D.; GEROGIANNI, N.; NAKOS, G.; MATAMIS, D. 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, 2012.
- AVENT, M.L.; ROGERS, B.A.; CHENG, A.C.; PATERSON, D.L. Current use of aminoglycosides: indications, pharmacokinetics and monitoring for toxicity. **Intern Med J**. v.41, n.6, p.441-449, 2011.
- AZUCENA, E.; MOBASHERY, S. Aminoglycoside-modifying enzymes: mechanisms of catalytic processes and inhibition. **Drug Resistance Updates**. v.4, p.106–117. 2001.
- BAKOUR, S.; TOUATI, A.; SAHLI, F. ; AMEUR, A.A. ; HAOUCHINE, D. ; ROLAIN, J.M. Antibiotic resistance determinants of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Algeria. **Diagn Microbiol Infect Dis**. v.76, n.4, p.529-531, 2013.
- BARCITTA, M.; CIPRESSO, R.; GIAQUINTA, L.; ROMEO, M.A.; DENARO, C.; PENNISI, C. Acquisition and spread of *Acinetobacter baumannii* and *Stenotrophomonas maltophilia* in intensive care patients. **Int J Hyg Environ Health**, v.212, p. 330–337. 2009.
- BARTUAL, S.G.; SEIFERT, H.; HIPPLER, C.; LUZON, M.A.D.; WISPLINGHOFF, H.; RODRIGUEZ-VALERA, F. Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical of *Acinetobacter baumannii*. **J Clin Microbiol**. v.43, n.9, p. 4382–4390, 2005.
- BASSETTI, M.; MERELLI, M.; TEMPERONI, C.; ASTILEAN, A. New antibiotics for bad bugs: where are we? **Ann Clin Microbiol Antimicrob**, v. 12, p.12:22, 2013.
- BAUMANN, P.; DOUDOROFF, M.; STANIER, R.Y. A study of the *Moraxella* group. II. Oxidative-negative species (genus *Acinetobacter*). **J Bacteriol**. 95:1520-41, 1968.
- BECKER, B.; COOPER, M.A. Aminoglycoside Antibiotics in the 21st Century. **ACS Chem Biol**, v.8, p.105–115, 2013.
- 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.
- BERGEN, P.J.; LI, J.; NATION, R.L. Dosing of colistin – back to basic PK/PD. **Curr Opin Pharmacol**. v.11, p.464–9, 2011.

- BERGOGNE-BEREZIN, E.; TOWNER, K.J. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. **Clin Microbiol Rev.** v.9, n.2, p.148-165. 1996.
- BONNIN, R.A.; NORDMANN, P.; POTRON, A.; LECUYER, H.; ZAHAR, J.; POIREL, L. Carbapenem-hydrolyzing GES-type extended-spectrum β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother.** v.55, n.1, p.349-354, 2011.
- BONNIN, R.A. ; POIREL, L. ; BENOIT-CATTIN, T. ; NORDMANN, P. Ceftazidime-susceptible and imipenem-non-susceptible OXA-58-producing *Acinetobacter baumannii* from the Comoros archipelago. **Int J Antimicrob Agents.** v. 41, p. 297-298. 2013.
- BOO, T.W.; WALSH, F.; CROWLEY, B: Molecular characterization of carbapenem resistant *Acinetobacter* species in an Irish university hospital: predominance of *Acinetobacter* genomic species 3. **J Med Microbiol.** v. 58, 209-216, 2009.
- BORGES, L.G.A.; DALLA VECHIA, V.; CORÇÃO, G. Characterisation 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. 2003.
- BOU, G.; CERVERO, G.; DOMINGUEZ, M. A.; QUEREDA, C.; MARTINEZ-BELTRAN, J. 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.635–643, 2000.
- BOU, G.; OTERO, F.M.; SANTISO, R.; TAMAYO, M.; FERNÁNDEZ MDEL, C.; TOMÁS, M.; GOSÁLVEZ, J.; FERNÁNDEZ, J.L. Fast Assessment of Resistance to Carbapenems and Ciprofloxacin of Clinical Strains of *Acinetobacter baumannii*, **J Clin Microbiol**, v.50, p. 3609 –3613, 2012.
- BOURIGAULT, C.; CORVEC, S.; BRETONNIÈRE, C.; GUILLOUZOUIC, A.; CRÉMET, L.; MARRAILLAC, J.; JUVIN, M.E.; BEMER, P.L.E.; GALLOU, F.; REYNAUD, A.; BOUTOILLE, D.; VILLERS, D.; LEPELLETIER, D. Investigation and management of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* spread in a French medical intensive care unit: one outbreak may hide another. **Am J Infect Control.** v.41, p.652-653, 2013.
- BOUVET, P. J. M.; GRIMONT, P. A. D. Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. **Int. J. Syst. Bacteriol.** v.36, p.228–240, 1986.
- BOWTON, D.L.; HITE, R.D.; MARTIN, R.S.; SHERERTZ, R. 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, 2013.
- BRISOU J, PREVOT AR. Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under *Acromobacter* group. **Ann Inst Pasteur**, 86:722-8, 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, p. 228–233, 2012.
- BROWN, S.; AMYES, S. OXA B-lactamases in *Acinetobacter*: the story so far. **J Antimicrob Chemother.** v.51, p.1-3, 2006.
- BUSH, K.; JACOBY, G.A. Updated functional classification of beta-lactamases. **Antimicrob Agents Chemother.** v.54, p.969-976, 2010.
- BUSH, K.; JACOBY, G.A.; MEDEIROS, A.A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrob Agents Chemother.** v.39, p.1211-1233, 1995.
- CALDWELLA, S.J; BERGHUISA, 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,** p. 1899 –1906, 2012.
- CAMBRAY, G.; GUEROUT, A.M.; MAZEL, D. Integrons. **Annu Rev Genet.** v.44, 141-166, 2010.
- CAPELLIER, G.; MOCKLY, H.; CHARPENTIER, C.; ANNANE, D.; BLASCO, G.; DESMETTRE, T.; ROCH, A.; FAISY, C.; COUSSON, J.; LIMAT, S.; MERCIER, M.; PAPAZIAN, L. Early-Onset Ventilator-Associated Pneumonia in Adults Randomized Clinical Trial: Comparison of 8 versus 15 Days of Antibiotic Treatment. **PLoS One.** v.7, 2012.
- CARRETTO, E.; BARBARINI, D.; DIJKSHOORN, L.; VAN DER REIJDEN, T.J.; BRISSE, S.; PASSET, V.; FARINA, C.; APSI *Acinetobacter* Study Group. Widespread carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* clones in Italian hospitals revealed by a multicenter study. **Infect Genet Evol,** v.6, p.1319-1326, 2011.
- CARNEIRO, M.; BARBOSA, P.I.; VESPERO, E.C.; TANITA, M.T.; CARRILHO, C.M.; PERUGINI, M.; SARIDAKIS, H.O.; POSSUELO, L.G.; RENNER, J.D.; VALIM, A.R.; TOGNIN, M.C.; MARTINS, A.F.; BARTH, A.L. Carbapenem-resistant OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* isolates causing ventilator-associated pneumonia. **Am J Infect Control.** v.38, n.8, p.667-9, 2010.
- CARVALHO, K.R.; CARVALHO-ASSEF, A.P.; PEIRANO, G.; SANTOS, L.C.; PEREIRA, M.J.; ASENSI, M.D. 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, p.25-28, 2009.
- CASERTA, R.A.; MARRA, A.R. ; DURÃO, M.S. ; SILVA, C.V. ; SANTOS, O.F.P. ; NEVES, H.S.; EDMOND, M.B.; TIMENETSKY, K.T.A program for sustained improvement in preventing ventilator associated pneumonia in an intensive care setting. **BMC Infect Dis.** v.12, p.234. 2012.

- CASIN, I.; HANAU-BERCOT, B.; PODGLAJEN, I.; VAHABOGLU, H.; COLLATZ, E.
Salmonella enterica serovar *Typhimurium* *bla*_{PER-1} carrying plasmid pSTI1 encodes an extended-spectrum aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase of type Ib. **Antimicrob Agents Chemother.** v.47, n.2, p.697-703, 2003.
- CASTANHEIRA, M.; TOLEMAN, M.A.; JONES, R.N.; SCHIMIDT, F.J.; WALSH, T.R.
Molecular characterization of a β -lactamase gene, *bla*_{GIM-1} encoding a new sub-class of metallo- β -lactamase. **Antimicrob Agents Chemother.** v.48. p.4654-4661, 2004.
- CAVALCANTI, F.L.; ALMEIDA, A.C.; VILELA, M.A.; DE MORAIS JUNIOR, M.A.; DE MORAIS, M.M.; LEAL-BALBINO, T.C. Emergence of extensively drug-resistant OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* in Recife, Brazil: risk of clonal dissemination? **Diagn Microbiol Infect Dis.** v. 77, p. 250-251. 2013.
- CEREDA, R.F.; AZEVEDO, H.D.; GIRARDELLO, R.; XAVIER, D.E.; GALES, A.C.; INVITA-A-CEFTO Brazilian Study Group. Brazilian Study Group. Antimicrobial activity of ceftobiprole against Gram-negative and Gram-positive pathogens: results from INVITA-A-CEFTO Brazilian study. **Braz J Infect Dis.** v.15, n.4, p.339-348, 2011.
- CHAN, J.Z.; HALACHEV, M.R.; LOMAN, N.J.; CONSTANTINIDOU, C.; PALLEN, M.J.
Defining bacterial species in the genomic era: insights from the genus *Acinetobacter* **BMC Microbiol.** v.12, p.302, 2012.
- CHEN, T.L.; SIU, L.K.; WU, R.C.; SHAIU, M.F.; HUANG, L.Y.; FUNG, C.P.; LEE, C.M.; CHO, W.L. 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, 2007.
- CHENG, G.; HAO, H.; DAI, M.; LIU, Z.; YUAN Z. Antibacterial action of quinolones: from target to network. **Eur J Med Chem.** v.66, p. 555-62, 2013.
- CHO, Y.J.; MOON, D.C.; JIN, J.S.; CHOI, C.H.; LEE, Y.C.; LEE, J.C. 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, 2009.
- CHU, Y.W.; AFZAL-SHAH, M.; HOUANG, E.T.; PALEPOU, M.I.; LYON, D.J.; WOODFORD, N.; LIVERMORE, D.M. IMP-4, a novel metallo- β -lactamase from nosocomial *Acinetobacter* spp. collected in Hong Kong between 1994 and 1998. **Antimicrob Agents Chemother.** v.45, p. 710-714, 2001.
- CICEK, A.C.; DÜZGÜN, A.O.; SARAL, A.; KAYMAN, T.; ÇİZMECİ, Z.; BALC, P.O.; DAL, T.; FIRAT, M.; TOSUN, I.; ALITNTOP, Y.A.; ÇALIŞKAN, A.; YAZICI, Y.; SANDALLI, C. 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. 2013.
- CLÍMACO, E.C.; OLIVEIRA, M.L.; PITONDO-SILVA, A.; OLIVEIRA, M.G.; MEDEIROS, M.; LINCOPAN, N.; DARINI, A.L. Clonal complexes 104, 109 and 113 playing a major role in the dissemination of OXA-carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in Southeast Brazil. **Infect Genet Evol.** v.19, p.127-133. 2013.

- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Nineteenth Informational Supplement M100-S21**. CLSI, Wayne, PA, USA, 2012.
- Coelho-Souza, T.; Reis, J.N.; Martins, N.; Martins, I.S.; Menezes, A.O.; Reis, M.G.; Silva, N.O.; Dias, R.C.; Riley, L.W.; Moreira, B.M. Longitudinal surveillance for meningitis by *Acinetobacter* in a large urban setting in Brazil. **Clin Microbiol Infect.** v.19, n.5, p.41-4, 2013.
- COX, G.; WRIGHT, G.D. Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. **Int J Med Microbiol.** v.303, p.287-292, 2013.
- DAI, N.; LI, D.Z.; CHEN, J.C. et. al. Drug-resistant genes carried by *Acinetobacter baumannii* isolated from patients with lower respiratory tract infection. **Chin Med J (Engl).** v.123, n.18, p.2571-2575, 2010.
- DALLA-COSTA, L.M.; COELHO, J.M.; SOUZA, H.A. P. H. M.; CASTRO, M.E.S.; STIER, C.J.N.; BRAGAGNOLO, K.L.; REA-NETO, A.; PENTEADO-FILHO, S.R.; LIVERMORE, D.M.; WOODFORD, N. Outbreak of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Producing the OXA-23 Enzyme in Curitiba, Brazil. **J Clin Microbiol.** v.41, n.7, p.3403-3406, 2003.
- DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiol Mol Biol Rev.** v.74, n.3, p. 417-433, 2010.
- DEVECI, O.; DAL, T.; TEKIN, R.; BOZKURT, F.; TEKIN, A.; DAYAN, S. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: where is it heading? **Infez Med.** v.21, p.211-215, 2013.
- DIANCOURT, L.; PASSET, V.; NEMEC, A.; DIJKSHOORN, L.; BRISSE, S. The Population Structure of *Acinetobacter baumannii*: Expanding Multiresistant Clones from an Ancestral Susceptible Genetic Pool. **PLoS ONE.** v.5, n.4, 2010.
- DIJKSHOORN, L.; NEMEC, A.; SEIFERT, H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Nature Reviews.** v.5, 2007.
- DOAN, T.L.; FUNG, H.B.; MEHTA, D.; RISK, P.F. Tigecycline: a glycolcycline antimicrobial agent. **Clin Ther.** v.28, n.8, p.1079-106. 2006.
- DOMINGUES, S.; SILVA, G.J.; NIELSEN, K.M. Integrons: Vehicles and pathways for horizontal dissemination in bacteria. **Mob Genet Elements**, v. 2, n. 5, p. 211–223, 2012.
- DRAWZ, S.M.; BONOMO, R.A. Three Decades of β -Lactamase Inhibitors. **Clin Microbiol Rev.** v.23, n.1, p.160-201, 2010.
- DZIDIC, S.; BEDEKOVIĆ, V. Horizontal gene transfer-emerging multidrug resistance in hospital bacteria. **Acta Pharmacol Sin.** v.24, p.519-526, 2003.

- DURMAZ, R.; OTLU, B.; KOKSAL, F.; HOSOGLU, S.; OZTURK, R.; ERSOY, Y.; AKTAS, E.; GURSOY, N.C.; CALISKAN, A. 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, p.372-377, 2009.
- EL-SAED, A.; BALKHY, H.H.; AL-DORZI, H.M.; KHAN, R.; RISHU, A.H.; ARABI, Y.M. *Acinetobacter* is the most common pathogen associated with late-onset and recurrent ventilator-associated pneumonia in an adult intensive care unit in Saudi Arabia. **Int J Infect Dis**. v.17, p. 696-701. 2013.
- EL SALABI, A. ; BORRA, P.S. ; TOLEMAN, M.A. Genetic and biochemical characterization of a novel metallo- β -lactamase, TMB-1, from an *Achromobacter xylosoxidans* strain isolated in Tripoli, Libya. **Antimicrob Agents Chemother**, v.56, p.2241-2245, 2012.
- EUCAST – The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (Basel, Suíça). **Breakpoints tables for interpretation of MICs and zone diameters**. EUCAST, v.2, 2011.
- EVANS, B.A.; HAMOUDA, A.; TOWNER, K.J.; AMYES, S.G.B. OXA-51-like beta-lactamases and their association with particular epidemic lineages of *Acinetobacter baumannii*. **Clin Microbiol Infect**, v.14, p. 268-275. 2008.
- EVEILLARD, M.; JOLY-GUILLOU, M.L. Emerging *Acinetobacter baumannii* infections and factors favouring their occurrence. **Pathol Biol** (Paris). v.60, n.5, p.314-319, 2012.
- 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, 2012.
- FERREIRA, A.E.; MARCHETTI, D.P.; CUNHA, G.R.; OLIVEIRA, L.M.; FUENTEFRIA, D.B.; DALL BELLO, A.G.; BARTH, A.L.; CORÇÃO, G. 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.725-730, 2011.
- FIGUEIREDO, D.Q.; SANTOS, K.R.; PEREIRA, E.M.; SCHUENCK, R.P.; MENDONÇA-SOUZA, C.R.; TEIXEIRA, L.M.; MONDINO, S.S. First report of the *bla*_{OXA-58} gene in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii* in Rio de Janeiro, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v.106, p.368-70, 2011.
- FIESTER, S.E.; ACTIS, L.A. Stress responses in the opportunistic pathogen *Acinetobacter baumannii*. **Future Microbiol**. v.8, n.3, p. 353-365, 2013.
- FISHBAIN, J.; PELEG, A.Y. Treatment of *Acinetobacter* infections. **Clin Infect Dis**. v.51, n.1, p.79-84, 2010.
- FOURNIER, PE; RICHET, H. The Epidemiology and Control of *Acinetobacter baumannii* in Health Care Facilities **Clin Infect Dis**. v.42, p.692–699, 2006.
- FOXMAN, B.; RILEY, L. Molecular epidemiology: focus on infection. **Am J Epidemiol**. v. 153. n.12. p. 1135-41. 2001.

- GADDY, J.A.; ACTIS, L.A. Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. **Future Microbiol**, v. 4, 273-278, 2009.
- 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 (2001e2004). **Clin Microbiol Infect**. v.12, p.315, 2006.
- GALES, A.C.; CASTANHEIRA, M., JONES, R.N.; SADER, H.S. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). **Diagn Microbiol Infect Dis**. v.73, n.4, p. 354-60. 2012.
- GARNACHO-MONTERO, J.; AMAYA-VILLAR, R. Multiresistant *Acinetobacter baumannii* infections: epidemiology and management *Curr Opin Infect Dis*. v.23, p.332–339, 2010.
- GAYNES, R.; EDWARDS, J.R. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. **Clin. Infect. Dis**. v.41, p.848–854, 2005.
- GERNER-SMIDT, P; TJERNBERG, I.; URSING, J. Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. **J Clin Microbiol**. v.29, p.277–282, 1991.
- GIAMARELLOU, H.; ANTONIADOU, A.; KANELLAKOPOULOU, K. *Acinetobacter baumannii*: a universal threat to public health? **Int J Antimicrob Agents**. v.32, n.2, p.106–119, 2008.
- GIONCO, B.; PELAYO, J.S.; VENANCIO, E.J.; CAYÔ, R.; GALES, A.C.; CARRARA-MARRONI, F.E. Detection of OXA-231, a new variant of *bla*_{OXA-143}, in *Acinetobacter baumannii* from Brazil: a case report. **J Antimicrob Chemother**. v.67, n.10, p.2531-2532, 2012.
- GODOY, C.S.M. Infecções por *Acinetobacter baumannii* em adultos admitidos em unidades de terapia intensiva (utis) de Goiânia e Aparecida de goiânia. **Dissertação de mestrado**. 2012.
- GORDON, N.C.; WAREHAM, D.W. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. **Int J Antimicrob Agents**. v.35, p.219-226, 2010.
- GUIDOS, R.J. Combating antimicrobial resistance: policy recommendations to save lives. **Clin Infect Dis**. v.52, n.5, p.397-428, 2011.
- GUSATTI, C. S.; BERTHOLDO, L.M.; OTTON, L.M.; MARCHETTI, D.P.; FERREIRA, A.E.; CORÇÃO, G. First occurrence of *bla*_{OXA-58} in *Acinetobacter baumannii* isolated from a clinical sample in Southern Brazil. **Braz J Microbiol**. v.43, p. 243-246. 2012.
- HAEILI, M.; GHODOUSI, A.; NOMANPOUR, B.; OMRANI, M.; FEIZABADI, M.M. Drug resistance patterns of bacteria isolated from patients with nosocomial pneumonia at Tehran hospitals during 2009-2011. **J Infect Dev Ctries**. v.7, n.4, p.312-317, 2013.

- HARTZELL, J.D.; KIM, A.S.; KORTEPETER, M.G.; MORAN, K.A. *Acinetobacter pneumonia: a review. Med Gen Med.* v.9, n.3, 2007.
- HAWLEY, J.S.; MURRAY, C.K.; JORGENSEN, J.H. Colistin heteroresistance in *Acinetobacter* and its association with previous colistin therapy. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 52, p.351, 2008.
- HERITIER, C.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of ISAbal in *Acinetobacter baumannii*. **Clin Microbiol Infect.** v. 12, p.123-130, 2006.
- HIGGINS, P.G.; DAMMHAYN, C.; HACKEL, M.; SEIFERT, H. Global spread of carbapenem resistance *Acinetobacter baumannii*. **J Antimicrob Chemother.** v. 65, p. 233-238, 2010.
- HIGGINS, P.G.; JANßEN, K.; FRESEN, M.M.; WISPLINGHOFF, H.; SEIFERT, H. 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, p. 3493–3500, 2012.
- HIRAKI, Y.; YOSHIDA, M.; MASUDA, Y.; INOUE, D.; TSUJI, Y.; KAMIMURA, H.; KARUBE, Y.; TAKAKI, K.; KAWANO, F. Successful treatment of skin and soft tissue infection due to carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* by ampicillin-sulbactam and meropenem combination therapy. **Int J Infect Dis.** v.17, n.12, p.1234-6, 2013.
- HOWARD, A.; O'DONOGHUE, M.; FEENEY A.; SLEATOR, R.D. *Acinetobacter baumannii*: An emerging opportunistic pathogen. **Virulence.** v.3, p.243-250, 2012.
- HUANG, L.Y.; LU, P.L.; CHEN, T.L.; CHANG, F.Y.; FUNG, C.P.; SIU, L.K. Molecular characterization of β -lactamase genes and their genetic structures in *Acinetobacter* genospecies 3 isolates in Taiwan. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 54, p.2699-2703. 2010.
- IKONOMIDIS A, POURNARAS S, MANIATIS AN, LEGAKIS NJ, TSAKRIS A. Discordance of meropenem versus imipenem activity against *Acinetobacter baumannii*. **Int J Antimicrob Agents.** v.28, 376-377, 2006.
- IRFAN, S.; TURTON, J.F.; MEHRAJ, J.; SIDDIQUI, S.Z.; HAIDER, S.; ZAFAR, A.; MEMON, B.; AFZAL, O.; HASAN, R. Molecular and epidemiological characterisation of clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from public and private sector intensive care units in Karachi, Pakistan. **J Hosp Infect.** v.78, n.2, p.143-148, 2011.
- JAIN, R.; DANZIGER, L.H. Multidrug-resistant *Acinetobacter* infections: an emerging challenge to clinicians. **Ann Pharmacother,** v.38, p.1449-1459, 2004.
- JANG, T.N.; LEE, S.H.; HUANG, C.H.; LEE, C.L.; CHEN, W.Y. Risk factors and impact of nosocomial *Acinetobacter baumannii* bloodstream infections in the adult intensive care unit: a case-control study. **J Hosp Infect.** v.73, n.2, p.143-150, 2009.

- JANSSEN, P.; MAQUELIN, K.; COOPMAN, R.; TJERNBERG, I.; BOUVET, P.; KERSTERS, K.; DIJKSHOORN, L. Discrimination of *Acinetobacter* Genomic Species by AFLP Fingerprinting. **Int J Syst Bacteriol**, v.47, p.1179–1187, 1997.
- JEAN, S.S.; HSUEH, P.R.; LEE, W.S.; YU, K.W.; LIAO, C.H.; CHANG, F.Y.; KO, W.C.; WU, J.J.; CHEN, Y.H. 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.457-62, 2013.
- JOHNSON, E. N.; BURNS, T. C.; HAYDA, R. A.; HOSPENTHAL, D. R.; MURRAY, C.K. Infectious complications of open type III tibial fractures among combat casualties. **Clin. Infect. Dis.** v.45, n.4, p.409–415, 2007.
- JONES, R.N.; DESHPANDE, L.; FRITSCH, T.R.; SADER, H.S. Determination of epidemic clonality among multidrug-resistant strains of *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* in the MYSTIC Programme (USA, 1999–2003). **Diagn Microbiol Infect Dis.** v.49, n.3, p.211-216, 2004.
- KARAIKOS, I.; GALANI, L.; BAZIACA, F.; GIAMARELLOU H. Intraventricular and intrathecal colistin as the last therapeutic resort for the treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* ventriculitis and meningitis: a literature review. **Int J Antimicrob Agents.** v.41, n.6, p.499-508, 2013.
- KAASE, M.; NORDMANN, P.; WICHELHAUS, T.A.; GATERMANN, S.G.; BONNIN, R.A.; POIREL, L. NDM-2 carbapenemase in *Acinetobacter baumannii* from Egypt. **J Antimicrob Chemother**, v.66, p.1260-1262, 2011. KAASE, M.; NORDMANN, P.; WICHELHAUS, T.A.; GATERMANN, S.G.; BONNIN, R.A.; POIREL, L. NDM-2 carbapenemase in *Acinetobacter baumannii* from Egypt. **J Antimicrob Chemother**, v.66, p.1260-1262, 2011.
- 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. 2011.
- KATSARAGAKIS, S.; MARKOGIANNAKIS, H.; TOUTOUZAS, K.G.; DRIMOUSIS, P.; LARENTZAKIS, A.; THEODORAKI, E.M.; THEODOROU, D. *Acinetobacter baumannii* infections in a surgical intensive care unit: predictors of multi-drug resistance. **World J Surg.** v.32, n.6, p.1194-1202, 2008.
- KIM, H.I.; KIM, S.W.; PARK, G.Y.; KWON, E.G.; KIM, H.H.; JEONG, J.Y. et al. The causes and treatment outcomes of 91 patients with adult nosocomial meningitis. **Korean J Intern Med**, v.27, p.171–179, 2012.
- KOHLBERG, A.; BRUMMER, S.; HIGGINS, P.G.; SOHR, D.; PIENING, B.C.; GRHAL, C. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the carbapenemase OXA-23 in a German university medical center. **J Med Microbiol**, v.58, p.1499-1507, 2009.

- KU, W.W.; KUNG, C.H.; LEE, C.H.; TSENG, C.P.; WU, P.F.; KUO, S.C.; CHEN, T.L.; LEE, Y.T.; WANG, F.D.; FUNG, C.P. Evolution of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: An 18-year longitudinal study from a medical center in northern Taiwan. **J Microbiol Immunol Infect.** v.13, p.121-127, 2013.
- LA SCOLA, B.; GUNDI, V.A.; KHAMIS, A.; RAOULT, D. Sequencing of the *rpoB* gene and flanking spacers for molecular identification of *Acinetobacter* species. **J Clin Microbiol.** v.44, n.3, p. 827-32, 2006.
- LAMBERT, T.; GERBAUD, G.; BOUVET, P.; VIEU, J.F.; COURVALIN, P. Dissemination of amikacin resistance gene *aphA6* in *Acinetobacter* spp. **Antimicrob Agents Chemother.** v.34, n.6, p.1244–1248, 1990.
- LAMBERT, T. Antibiotics that affect the ribosome. **Rev Sci Tech,** v.31, p.57-64, 2012.
- LAURETTI, L.; RICCIO, M.L.; MAZZARIOL, A.; CORNAGLIA, G.; AMICOSANTE, G.; FONTANA, R.; ROSSOLINI, G.M. Cloning and characterization of *bla_{VIM}*, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. **Antimicrob Agents Chemother.** v.43, p.1584-1590, 1999.
- LEE, H. W.; KOH, Y. M.; KIM, J.; LEE, J. C.; LEE, Y. C. Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. **Clin. Microbiol. Infect,** v.14, p. 49–54, 2008.
- LEE, K.; YUM, J.H.; YONG, D.; LEE, H.M.; KIM, H.D.; DOCQUIER, J.D.; ROSSOLINI, G.M.; CHONG, Y. Novel acquired metallo- β -lactamase gene, *bla_{SIM-1}*, a in class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. **Antimicrob Agents Chemother.** v.49. p.4485-4491, 2005.
- LEE, M.H.; CHEN, T.L.; LEE, Y.T.; HUANG, L.; KUO, S.C.; YU, K.W. Dissemination of multidrugresistant *Acinetobacter baumannii* carrying *bla_{OXA-23}* from hospitals in central Taiwan. **J Microbiol Immunol Infect,** v.12, 2012.
- LI, J.; RAYNER, C.R.; NATION, R.L.; OWEN, R.J.; SPELMAN, D.; TAN, K.E.; LIOLIOS, L. Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother.** v.50, n.9, p.2946-2950, 2006.
- LI, M.; PAN, P.; HU, C. Pathogen distribution and antibiotic resistance for hospital acquired pneumonia in respiratory medicine intensive care unit. **Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban,** v.38, n.3, p.251-257, 2013.
- 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, p. 902-905, 2007.
- LIN, Y.C.; SHENG, W.H.; CHEN, Y.C.; CHANG, S.C.; HSIA, K.C.; LI, S.Y. Differences in carbapenem resistance genes among *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter* genospecies 3 and *Acinetobacter* genospecies 13TU in Taiwan. **Int J Antimicrob Agents,** v. 35, p. 439-443, 2010.

- LIN, M.; LIOU, M.; TU, C.; YEH, H.; LAN, C. Molecular Epidemiology of Integron-Associated Antimicrobial Gene Cassettes in the Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii* from Northern Taiwan. **Ann Lab Med**. v. 33, n.4, p. 242–247, 2013.
- LIVERMORE, D.M. Fourteen years in resistance. **Int J Antimicrob Agents** , v.39, p.283-294, 2012.
- LLACA-DÍAZ, J.M.; MENDOZA-OLAZARÁN, S.; CAMACHO-ORTIZ, A.; FLORES, S.; GARZA-GONZÁLEZ, E. One-year surveillance of ESKAPE pathogens in an intensive care unit of Monterrey, Mexico. **Chemotherapy**. v.58, n.6, p.475-481, 2012.
- LUNA, C.M.; ARUJ, P.K. Nosocomial *Acinetobacter* pneumonia. **Respirology**, v.12, p. 787–791, 2007.
- MCCONNELL, M.J. ; ACTIS, L. ; PACHON, J. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. **FEMS Microbiol Rev**, v.37, p.130-155, 2013.
- MAGIORAKOS, A.P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R.B. 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. 268-281, 2012.
- 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, 2001.
- MAMMINA, C.; PALMA, D.M.; BONURA, C.; ALEO, A.; FASCIANA, T.; SODANO, C.; SAPORITO, M.A.; VERDE, M.S.; CALÀ, C.; CRACCHIOLO, A.N.; TETAMO, R. Epidemiology and clonality of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from an intensive care unit in Palermo, Italy. **BMC Research Notes**. v.5, p.365, 2012.
- MANCHANDA, V.; SANCHAITA, S.; SINGH, N.P. Multidrug Resistant *Acinetobacter*. **J Glob Infect Dis**. v.2, n.3, p.291–304, 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. 2008.
- MARRA, A.R.; CAMARGO, L.F.A; PIGNATARI, A.C.C.; SUKIENNIK, T.; BEHAR, P.R.P.; MEDEIROS, E.A.S.; RIBEIRO, J.; GIRÃO, E.; CORREA, L.; GUERRA, C.; BRITES, C.; PEREIRA, C.A.P.; CARNEIRO, I.; REIS, M.; SOUZA, M.A.; TRANCHESI, R.; BARATA, C.U.; EDMOND, M.B. 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, 2011.
- MARTÍNEZ, P.; MATTAR, S. Imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the IS*Aba1*-*bla*_{OXA-23,51} and IS*Aba1*-*bla*_{ADC-7} genes in Monteria, Colombia. **Braz J Microbiol**. v.43, n.4, p.1274-1280, 2012.

- MARTINS, A.F.; KUCHENBECKER, R.; SUKIENNIK, T.; BOFF, R.; REITER, K.C.; LUTZ, L.; MACHADO, A.B.; BARTH, A.L. Carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme: dissemination in Southern Brazil. **Infection**, v.37, p.474-476, 2009.
- MARTINS, A.; HUNYADI, A.; AMARAL, L. Mechanisms of Resistance in Bacteria: An Evolutionary Approach. **Open Microbiol J**. v. 7, p.53-58, 2013.
- MARTINS, N.; DALLA-COSTA, L.; UEHARA, A.A.; RILEY, L.W.; MOREIRA, B.M. Emergence of *Acinetobacter baumannii* international clone II in Brazil: Reflection of a global expansion **Infect. Genet Evol.** v.20, p.378, 2013.
- MERKIER, A.K.; CATALANO, N.; RAMIREZ, M.S.; QUIROGA, C.; ORMAN, B.; RATIER, L. Polyclonal spreads of blaOXA-23 and blaOXA-58 in *Acinetobacter baumannii* isolates from Argentina. **J Infect Dev Ctries**, v.3, p.235-240, 2008.
- MENDES, R.E.; BELL, J.M.; TURNIDGE, J.D.; CASTANHEIRA, M.; JONES, R.N. Emergence and widespread dissemination of OXA-23, -24/40, and -58 carbapenemases among *Acinetobacter* spp in Asia-Pacific nations: report from the SENTRY Surveillance Program. **J Antimicrob Chemother**, v.63, p.55-59, 2009.
- METAN, G.; ALP, E.; AYGEN, B.; SUMERKAN, B. Carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii*: an emerging threat for patients with post-neurosurgical meningitis. **Int J Antimicrob Agents**. v.29, p.112-113, 2007.
- METAN, G.; SARIGUZEL, F.; SUMERKAN, B.; REIJDEN, T.V.; DIJKSHOORN, L. Clonal diversity and high prevalence of OXA-58 among *Acinetobacter baumannii* isolates from blood cultures in a tertiary care centre in Turkey. **Infect Genet Evol**, v.16, p. 447-448, 2013.
- MCCRACKEN, M.; DECORBY, M.; FULLER, J.; LOO, V.; HOBAN, D.J.; ZHANEL, G.G.; MULVEY, M.R. Identification of mMETAN, G.; SARIGUZEL, F.; SUMERKAN, B.; REIJDEN, T.V.; DIJKSHOORN, L. Clonal diversity and high prevalence of OXA-58 among *Acinetobacter baumannii* isolates from blood cultures in a tertiary care centre in Turkey. **Infect Genet Evol**, v.16, p. 447-448, 2013.
- MIRIAGOU, V.; CORNAGLIA, G.; EDELSTEIN, M.; GALANI, I.; GISKE, C.G.; GNIADKOWSKI, M.; MALAMOU-LADA, E.; MARTINEZ-MARTINEZ, L.; NAVARRO, F.; NORDMANN, P.; PEIXE, L.; POURNARAS, S.; ROSSOLINI, G.M.; TSAKRIS, A.; VATOPOULOS, A.; CANTO'N, R. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. **Clin Microbiol Infect**, v.16, p. 112-122, 2010.
- MOFFATT, J.A.; HARPER, M.; ADLER, B.; NATION, R.L.; LI, J.; BOYCE, J.D. Insertion Sequence IS*Aba11* Is Involved in Colistin Resistance and Loss of Lipopolysaccharide in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**. v.55, n.6, p.3022-3024, 2011.
- MONIRI, R.; FARAHANI, R.K.; SHAJARI, G.; SHIRAZI, M.N.; GHASEMI, A. Molecular Epidemiology of Aminoglycosides Resistance in *Acinetobacter* spp. with Emergence of Multidrug-Resistant Strains. **Iran J Public Health**. v.39, n.2, p. 63-68, 2010.

- MORFÍN-OTERO, R.; ALCÁNTAR-CURIEL, M.D.; ROCHA, M.J.; ALPUCHE-ARANDA, C.M.; SANTOS-PRECIADO, J.I.; GAYOSSO-VÁZQUEZ, C.; ARAIZA-NAVARRO, J.R.; FLORES-VACA, M.; ESPARZA-AHUMADA, S.; GONZÁLEZ-DÍAZ, E.; PÉREZ-GÓMEZ, H.R.; RODRÍGUEZ-NORIEGA, E. *Acinetobacter baumannii* infections in a tertiary care hospital in Mexico over the past 13 years. **Chemotherapy**. v.59, p.57-65, 2013.
- MOSTACHIO, A.K.; LEVIN, A.S.; RIZEK, C.; ROSSI, F.; ZERBINI, J.; COSTA, S.F. High prevalence of OXA-143 and alteration of outer membrane proteins in carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. isolates in Brazil. **Int J Antimicrob Agents**. v.5, p.396-401, 2012.
- MUGNIER, P.D.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Functional analysis of insertion sequence IS*Aba1*, responsible for genomic plasticity of *Acinetobacter baumannii*. **J Bacteriol**, v.191, p.:2414-2418, 2009.
- MUNOZ-PRICE, L.S.; WEINSTEIN, R.A. *Acinetobacter* infection. **N Engl J Med**. n.358, p.1271-1281, 2008.
- National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, Data Summary from January 1992–June 2001. **Am J Infect Control**, v.29, 404–421, 2001.
- NEMEC, A.; DOLZANI, L.; BRISSE, S.; VAN DEN BROEK, P.; DIJKSHOORN, L. 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, n.12, p.1233-1240, 2004.
- NEMEC, A. Antimicrobial resistance and clonality in ***Acinetobacter baumannii***. Tese de doutorado, 2009.
- NEMEC, A.; KRIZOVA, L.; MAIXNEROVA, M.; VAN DER REIJDEN, T.J.; DESCHAGHT, P.; PASSET, V.; VANECHOUTTE, M.; BRISSE, S.; DIJKSHOORN, L. Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus* *Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). **Res Microbiol**, v. 162, p.393-404, 2011.
- 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, p.1504–1509, 2011.
- NORSKOV-LAURITSEN, N.; MARCHANDIN, H.; DOWZICKY, M.J. 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, 2009.
- OSANO, E.; ARAKAWA, Y.; WACHAROTAYANKUN, R.; OHTA, M.; HORII, T.; ITO, H.; YOSHIMURA, F.; KATO, N. Molecular characterization of an enterobacterial

- metallo β -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. **Antimicrob Agents Chemother.** v.38, p.71-78, 1994.
- PAPP-WALLACE, K.M.; ENDIMIANI, A.; TARACILA, M.A.; BONOMO, R.A.
Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrob Agents Chemother.* v.55, n.11, p.4943-60, 2011.
- PATON, R.; MILES, R.S.; HOOD, J. et al. ARI-1: β -lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Int J Antimicrob Agents.** v.2, n.2, p. 81–87. 1993.
- PAUL, M.; BISHARA, J.; LEVCOVICH, A.; CHOWERS, M.; GOLDBERG, E.; SINGER, P.; LEV, S.; LEON, P.; RASKIN, M.; YAHAV, D.; LEIBOVICI, L. Effectiveness and safety of colistin: prospective comparative cohort study. **J Antimicrob Chemother** v.65, n. 5, p.1019-1027, 2010.
- PELEG, A.; SEIFERT, H.; PATERSON, D.L. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. **Clin Microbiol Rev.** v.21, n.3, p. 538–582, 2008.
- PEREIRA, C.A.P.; MARRA, A.R.; CAMARGO, L.F.A; PIGNATARI, A.C.C.; SUKIENNIK, T.; BEHAR, P.R.P; MEDEIROS, E.A.S; RIBEIRO, J.; GIRÃO, E.; CORREA, L.; GUERRA, C.; CARNEIRO, I.; BRITES, C.; REIS, M.; SOUZA, M.A.S.; TRANCHESI, R.; BARATA, C.U.; EDMOND, M.B. Brazilian SCOPE Study Group. Nosocomial Bloodstream Infections in Brazilian Pediatric Patients: Microbiology, Epidemiology, and Clinical Features. **PLoS One.** v. 8, n.7. 2013.
- PEYMANI, A.; HIGGINS, P.G.; NAHAEI, M.R.; FARAJNIA, S.; SEIFERT, H.
Characterisation and clonal dissemination of OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* in Tabriz, northwest Iran. **Int J Antimicrob Agents,** v.39, p. 526–528, 2012.
- PITOUT, J.D.D.; GREGSON, D.B.; POIREL, L.; MCCLURE, J.; LE, P.; CHURCH, D.L.
Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing Metallo- β -Lactamases in a large centralized laboratory. **J. Clin. Microb.** vol. 43. n. 7, p. 3129–3135. 2005.
- POIREL, L.; NAAS, T.; DELPHINE, N.; COLLET, L.; BELLAIS, S.; CAVALLO, J. D.; NORDMANN, P. Characterization of VIM-2, a Carbapenem-Hydrolyzing Metallo- β -Lactamase and Its Plasmid- and Integron-Born Gene from a *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolate in France. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 44, p. 891-897. 2000a.
- POIREL, L.; LE THOMAS, I.; NAAS, T.; KARIM, A.; NORDMANN, P. Biochemical Sequence Analyses of GES-1, a Novel Class A Extended-Spectrum β -Lactamase, and the Class 1 Integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 44. n.3. p. 622–632. 2000b.
- POIREL, L.; MARQUÉ, S.; HÉRITIER, C.; SEGONDS, C. ; CHABANON, G. ; NORDMANN, P. OXA-58, a novel class D β -Lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother,** v.49, p. 202-208, 2005.
- POIREL, L.; NORDMANN, P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. **Clin Microbiol Infect.** v.12, p.826-836, 2006.

- POIREL, L.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, J.; AL NAIEMI, N.; DEBETS-OSSSENKOPP, Y.; NORDMANN, P. Characterization of bla_{DIM-1}, a novel integron-located metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas stutzeri* clinical isolate in the Netherlands. **19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**. 2009.
- POIREL, L.; NAAS, T.; NORDMANN, P. Diversity, Epidemiology, and Genetics of Class D Beta-Lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, p. 24–38 v. 54, p. 24-38, 2010.
- QUALE, J.; BRATU, S.; LANDMAN, D.; HEDDURSHETTI, R. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* endemic in New York City. **Clin Infect Dis**. v.37, p. 214–220, 2003.
- QUEENAN, A.M.; BUSH, K. Carbapenemases: the Versatile β -Lactamases. **Clin Microbiol Rev** v. 20. p.440-458. 2007.
- OLAITAN, A.O.; BERRAZEG, M.; FAGADE, O.E.; ADELOWO, O.O.; ALLI, J.A.; ROLAIN, J.M. Emergence of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 carbapenemase, Nigeria. **Int J Infect Dis**. v.17, 469-470, 2013.
- OLIVEIRA, M. S. Tratamento de infecções causadas por *Acinetobacter* spp. Resistentes a carbapenem, 2007. 98p. **Dissertação de mestrado** em Ciências - São paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007.
- OPAZO, A.; DOMÍNGUEZ, M.; BELLO, H.; AMYES, S.G.; GONZÁLEZ-ROCHA, G. OXA-type carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* in South America. **J Infect Dev Ctries**, v.13, 311-316, 2012.
- RAMIREZ, M.S.; TOLMASKY, M.E. Aminoglycoside Modifying Enzymes. **Drug Resist Updat**. v.13, p.151–171, 2010.
- RESENDE, M.M.; MONTEIRO, S.G.; CALLEGARI, B.; FIGUEIREDO, P.M.; MONTEIRO, C.R.; MONTEIRO-NETO, V. Epidemiology and outcomes of ventilator-associated pneumonia in northern Brazil: an analytical descriptive prospective cohort study. **BMC Infect Dis**. v.5, n.13, p.119.2013.
- RIBERA, A.; VILA, J.; FERNÁNDEZ-CUENCA, F.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; PASCUAL, A.; BECEIRO A. et al. Type 1 integrons in epidemiologically unrelated *Acinetobacter baumannii* isolates collected at Spanish hospitals. **Antimicrob Agents Chemother**. v.48, n.1, p.364–65, 2004.
- RIJNDERS, B.J.A; VAN WIJNGAERDEN, E.; PEETERMANS, W.E. Catheter-Tip Colonization as a Surrogate End Point in Clinical Studies on Catheter-Related Bloodstream Infection: How Strong Is the Evidence? **Clin Infect Dis**. v.35, p.1053–1058, 2002.
- ROBLEDO, I.E.; AQUINO, E.E.; SANTÉ, M.I.; SANTANA, J.L.; OTERO, D.M.; LEÓN, C.F.; VÁZQUEZ, G.J. Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. **Antimicrob Agents Chemother**. v.54, p.1354-1357, 2010.

- RODRIGUES, P.M.; CARMO-NETO, E.; SANTOS, L.R.; KNIBEL, M.F. Ventilator-associated pneumonia: epidemiology and impact on the clinical evolution of ICU patients. **J Bras Pneumol.** v.35, n.11, p.1084-91. 2009.
- RUAN, Z.; CHEN, Y.; JIANG, Y.; ZHOU, H.; ZHOU, Z.; FU, Y.; WANG, H.; WANG, Y.; YU, Y. Wide distribution of CC92 carbapenem-resistant and OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* in multiple provinces of China. **Int J Antimicrob Agents.** v.42, n.4, p.322-8, 2013.
- RUMBO, C.; FERNÁNDEZ-MOREIRA, E.; MERINO, M.; POZA, M.; MENDEZ, J.A.; SOARES, N.C.; MOSQUERA, A.; CHAVES, F.; BOU, G. Horizontal Transfer of the OXA-24 Carbapenemase Gene via Outer Membrane Vesicles: a New Mechanism of Dissemination of Carbapenem Resistance Genes in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother.** v.55, n.7, p.3084–3090, 2011.
- SABAT, A.J.; BUDIMIR, A.; NASHEV3, D.; SÁ-LEÃ4, R.; VAN DIJL, J.M.; LAURENT, F.; GRUNDMANN, H.; FRIEDRICH, A.W. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. **Euro Surveill,** v. 18, 2013.
- SACAR, S.; TURGUT, H.; TOPRAK, S.; CIRAK, B.; COSKUN, E.; YILMAZ, O. et al. A retrospective study of central nervous system shunt infections diagnosed in a university hospital during a 4-year period. **BMC Infect Dis.** v.6, p.43, 2006.
- SADER, H.S. ; HOLLIS, R.J. ; PFALLER, M.A. The use of molecular techniques in the epidemiology and control of infectious diseases. **Clin Lab Med.** v. 15, n. 2. p. 407-431. 1995.
- 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, 2013.
- SAEED, S.; FAKIH, M.G.; RIEDERER, K.; SHAH, A.R.; KHATIB, R. 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, p. 981-983, 2006.
- SAFDAR, N.; DEZFULIAN, C.; COLLARD, H.R.; SAINT, S. Clinical and economic consequences of ventilator-associated pneumonia: a systematic review. **Crit Care Med.** v.33, p.2184–2193, 2005.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. **Cold Spring Harbor Laboratory Press,** Cold Spring Harbor, New York, 2001.
- SAULE, M.; SAMUELSEN, O.; DUMPIS, U.; SUNDSFJORD, A.; KARLSONE, A.; BALODE, A.; MIKLASEVICS, E.; KARAH, N. Dissemination of a carbapenem - resistant *Acinetobacter baumannii* strain belonging to international clone II/sequence type 2 and harboring a novel AbaR4-like resistance island in Latvia. **Antimicrob Agents Chemother.** v.2, p.1069-72, 2013.

- 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. 2007.
- SCHRECKENBERGER, P.C.; DANESHVAR, M.I.; WEYANT, R.S.; HOLLIS, D.G. *Acinetobacter, Achromobacter, Chryseobacterium, Moraxella*, and other nonfermentative Gram-negative rods. In: Murray, P.R.; Baron, E.J.; Jorgensen, J.H.; Tenover, M.A.; Tenover, R.H. eds. Manual of clinical microbiology, 8th ed. Washington, DC: ASM Press, 2003.
- SEKIGUCHI, J.; MORITA, K.; KITAO, T.; WATANABE, N.; OKAZAKI, M.; MIYOSHI-AKIYAMA, T.; KANAMORI, M.; KIRIKAE, T. KHM-1, a novel plasmid-mediated metallo- β -lactamase from a *Citrobacter freundii* clinical isolate. **Antimicrob Agents Chemother.** v.52, n.11, p.4194-4197. 2008.
- SEWARD, R. J.; LAMBERT, T.; TOWNER, K.J. Molecular epidemiology of aminoglycoside resistance in *Acinetobacter* spp. **J Med Microbiol.** v.47, n.5, p. 455-462, 1998.
- SEGAL, H.; GARNY, S.; ELISHA, B.G. Is ISABA-1 customized for *Acinetobacter*? **FEMS Microbiol Lett**, v.243, p.425-429, 2005.
- SENKYRIKOVA, M.; HUSICKOVA, V.; CHROMA, M.; SAUER, P.; BARDON, J.; KOLAR, M. *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 detected in the Czech Republic. **Springerplus.** v.2, n.1, p.296, 2013.
- SHAH, P.M.; ISAACS, R.D. Ertapenem, the first of a new group of carbapenems. **J Antimicrob Chemother.** v. 52. p. 538–542. 2003.
- SHAHCHERAGHI, F.; ABBASALIPOUR, M.; FEIZABADI, M.; EBRAHIMIPOUR, G.; AKBARI, N. Isolation and genetic characterization of metallo- β -lactamase and carbapenamase producing strains of *Acinetobacter baumannii* from patients at Tehran hospitals. **Iran J Microbiol.** v.3, p.68-74. 2011.
- SHAW, K.J.; RATHER, P.N.; SHARE, R.S.; MILLER, G.H. Molecular Genetics of Aminoglycoside Resistance Genes and Familial Relationships of the Aminoglycoside-Modifying Enzymes. **Microbiol Rev.** v.57, n.1, p. 138–163, 1993.
- SHIN, J.A.; CHANG, Y.S.; KIM, H.J.; KIM, S.K.; CHANG, J.; AHN, C.M.; BYUN, M.K. Clinical outcomes of tigecycline in the treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection. **Yonsei Med J.** v. 53, n.5, p.974-84. 2012.
- SINGH, A.; GOERING, R.V.; SIMJEE, S.; FOLEY, S.L.; ZERVOS, M. J. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. **Clin Microbiol.** v. 19. n. 3. p. 512-530.2006
- SIMONETTI A, OTTAIANO E, DIANA MV, ONZA C, TRIASSI M. Epidemiology of hospital-acquired infections in an adult intensive care unit: results of a prospective cohort study. **Ann Ig.** v.25, n.4, p.281-289,2013.

- SOULI, M.; GALANI, I.; GIAMARELLOU, H. Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. **Euro Surveill.** v.13, p.19045. 2008.
- STEIN, G.E.; BABINCHAK, T. Tigecycline: an update. **Diagn Microbiol Infect Dis.** v.75, n.4, p.331-6, 2013.
- STIETZ, M.S.; RAMÍREZ, M.S.; VILACOBÁ, E.; MERKIER, A.K.; LIMANSKY, A.S.; CENTRÓN, D.; CATALANO, M. *Acinetobacter baumannii* extensively drug resistant lineages in Buenos Aires hospitals differ from the international clones I-III. **Infect Genet Evol.** v.14, p.294-301, 2013.
- SUNG, J.Y.; KWON, K.C.; CHO, H.H.; KOO, S.H. Antimicrobial Resistance Determinants in Imipenem-nonsusceptible *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* Complex Isolated in Daejeon, Korea. **Korean J Lab Med.** v.31, p.265-270. 2011.
- SUZUKI, S.; MATSUI, M.; SUZUKI, M.; SUGITA, A.; KOSUGE, Y.; KODAMA, N.; ICHISE, Y.; SHIBAYAMA, K. Detection of tripoli metallo- β -lactamase 2 (TMB-2), a variant of *bla*_{TMB-1}, in clinical isolates of *Acinetobacter* spp. in Japan. **J Antimicrob Chemother.** v. 68, p. 1441-1442, 2013.
- TEJERINA, E.; FRUTOS-VIVAR, F.; RESTREPO, M.I. et al. Incidence, risk factors, and outcome of ventilator-associated pneumonia. **J Crit Care** v.21, n.1, p.56-65, 2006.
- TIAN, G.; ADAMS-HADUCH, J.M.; TARACILA, M.; BONOMO, R.A.; WANG, H.; DÓI, Y. Extended-Spectrum AmpC Cephalosporinase in *Acinetobacter baumannii*: ADC-56 Confers Resistance to Cefepime. **Antimicrob Agents Chemother.** v.55, n.10, p.4922–4925. 2011.
- THANBICHLER, M.; SHAPIRO, L. Getting organized how bacterial cells move proteins and DNA. **Nat Rev Microbiol.** v.6, n.1, p. 28-40, 2008.
- THOM, K.A.; HARRIS, A.D.; JOHNSON, J.A. et al. Low prevalence of *Acinetobacter baumannii* colonization on hospital admission. **Am. J. Infect Control.** v.38, n.4, p.329-31, 2010.
- TOLEMAN, M.A.; SIMM, A.M.; MURPHY, T. A.; GALES, A.C.; BIEDENBACH, D.J.; JONES, R.N.; WALSH, T.R. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. **J Antimicrob Chemother.** v.50, p.673-679, 2002.
- TOGNIM, M.C.; ANDRADE, S.S.; SILBERT, S.; GALES, A.C.; JONES, R.N.; SADER, H.S. 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, 2004.
- TROTTIER, V.; SEGURA, P.G.; NAMIAS, N.; KING, D.; PIZANO, L. R.; SCHULMAN, C.I. Outcomes of *Acinetobacter baumannii* infection in critically ill burned patients. **J. Burn Care Res.** v.28, p. 248–254, 2007.

- TURTON, J.F.; WARD, M.E.; WOODFORD, N.; KAUFMANN, M.E.; PIKE, R.; LIVERMORE, D.M.; PITT, T.L. The role of ISAbal in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 258, p.72-77, 2006.
- TURTON, J.F.; SHAH, J.; OZONGWU, C.; PIKE, R. Incidence of *Acinetobacter* species other than *A. baumannii* among clinical isolates of *Acinetobacter*: evidence for emerging species. **J Clin Microbiol**, v. 48, p.1445-1449, 2010.
- URBAN, C.S.; SEGAL-MAURER, S.; RAHAL, J.J. Considerations in control and treatment of nosocomial infections due to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Clin Infect Dis**. v.36, p. 1268–1274, 2003.
- VAARA, M. Novel derivatives of polymyxins. **J Antimicrob. Chemother.** v.68, n.6, p.1213-1219, 2013.
- VAN DE BEEK, D.; DRAKE, J.M.; TUNKEL, A.R. Nosocomial bacterial meningitis. **N Engl J Med** .v.362, p.146-154, 2010.
- VAN DEN BROEK, P. J.; VAN DER REIJDEN, T. J. K.; VAN STRIJEN, E.; HELMIG-SCHURTER, A. V.; BERNARDS, A. T.; DIJKSHOORN, L. Endemic and Epidemic *Acinetobacter* Species in a University Hospital: an 8-Year Survey. *J Clin. Microbiol.* v. 47, n.11, p. 3593–3599. 2009.
- VAN DUIN, D.; KAYE, K.S.; NEUNER, E.A.; BONOMO, R.A. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: a review of treatment and outcomes. **Diagn Microbiol Infect Dis**. v.2, p.115-20, 2013.
- VAKULENKO, S.B.; MOBASHER, Y. S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. **Clin Microbiol Rev**. v.16, p. 430–450. 2003.
- VILA, J.; MARCOS, A.; MARCO, F.; ABDALLA, S.; VERGARA, Y.; REIG, R.; GOMEZ-LUS, R.; JIMENEZ DE ANTA, T. 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. 1993.
- VILLALÓN, P.; VALDEZATE, S.; MEDINA-PASCUAL, M.J.; CARRASCO, G.; VINDEL, A.; SAEZ-NIETO JA. Epidemiology of the *Acinetobacter*-derived cephalosporinase, carbapenem-hydrolysing oxacillinase and metallo- β -lactamase genes, and of common insertion sequences, in epidemic clones of *Acinetobacter baumannii* from Spain. **J Antimicrob Chemother**. v.68, n.3, p.550-553, 2013.
- VILLEGAS, M.V.; KATTAN, J.N.; CORREA, A.; LOLANS, K.; GUZMAN, A.M.; WOODFORD, N. Dissemination of *Acinetobacter baumannii* clones with OXA-23 carbapenemase in Colombian hospitals. **Antimicrob Agents Chemother**, v.51, n.6, p.2001-2004, 2007.
- WALTHER-RASMUSSEN, J; HOIBY, N. OXA-type carbapenemases. **J Antimicrob Chemother**. v.57, n.3, p.373-383, 2006.

- WALSH, T.R. Clinically significant carbapenemases: an update. **Curr Opin Infect Dis**, v.21, p.367-371, 2008.
- WALSH, T.R. Emerging carbapenemases: a global perspective. **Int J Antimicrob Agents**, v. 36, p.8-14, 2010.
- WACHINO, J; ARAKAWA, Y. 2012 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, 2012.
- WANG, H; GUO, P.; SUN, H.; WANG, H.; YANG, Q.; CHEN, M.; XU, Y.; ZHU, Y. Molecular epidemiology of clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. from Chinese hospitals. **Antimicrob Agents Chemother**. v.51, n.11, p.4022-8, 2007.
- WANG, X.H.; ZONG, Z.Y.; LÜ, X.J. Clonal relatedness of bla(OXA-58) carrying *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. **Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban**, v. 44, p. 405-409. 2013.
- WERNECK, J.S.; PICÃO, R.C.; CARVALHAES, C.G.; CARDOSO, J.P.; GALES, A.C. OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* in Brazil: a case report. **J Antimicrob Chemother**. v.66, p. 452-454. 2011.
- WILKE, M.S.; LOVERING, A.L.; STRYNADKA, N.C. Beta-lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. **Curr Opin Microbiol**. v.8, n.5, p.525-533, 2005.
- WILLIAMS, J.D. β -lactamases and β -lactamase inhibitors. *Inter. J. Antimicrob. Agents*, v.12, p.3-7, 1999.
- WISPLINGHOFF, H.; BISCHOFF, T.; TALLENT, S.M.; SEIFERT, H.; WENZEL, R.P. EDMOND, M.B. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Clin Infect Dis**. v.39, p.309–317, 2004.
- WOODFORD, N.; ELLINGTON, MJ.; COELHO, J.M.; TURTON, J.F.; WARD, M.E.; BROWN, S.; AMYES, S.G.; LIVERMORE, D.M. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. **Int J Antimicrob Agents**. v.27, n.4, p.351-3, 2006.
- WRIGHT, G.D.; THOMPSON, P.R. Aminoglycoside phosphotransferases: proteins, structure, and mechanism. **Front Biosci**. v.4, p.9–21, 1999.
- YAHAV, D.; FARBMAN, L.; LEIBOVICI, L. et al. Colistin: new lessons on an old antibiotic. **Clin Microbiol Infect**. v.18, p.18–29, 2011.
- YAN, J.J.; HSUEH, P.; KO, W.; LUH, W.; TSAI, S.; WU, H.; WU, J.J. Metallo- β -Lactamases in Clinical *Pseudomonas* Isolates in Taiwan and Identification of VIM-3, a Novel Variant of the VIM-2 Enzyme. **Antimicrob Agents Chemother**. p. 2224–2228, 2001.

- YAU, W.; OWEN, R.J.; POUDYAL, A.; BELL, J.M.; TURNIDGE, J.D.; YU, H.H.; NATION, R.L.; LI, J. Colistin hetero-resistance in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from the Western Pacific region in the SENTRY antimicrobial surveillance programme. **J Infect.** v.58, n.2, p.138-44. 2009.
- YIGIT, H.; QUEENAN, A.M.; ANDERSON, G.J.; DOMENECH-SANCHEZ, A.; BIDDLE, J.W.; STEWARD, C.D.; ALBERTI, S.; BUSH, K.; TENOVER, F.C. Novel Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother.** v.45, n.4, p.1151-1161, 2001.
- YONG, D.; BELL, J. M.; RITCHIE, B.; PRATT, R.; TOLEMAN, M. A.; WALSH, T. R. A novel sub-group metallo- β -lactamase (MBL), AIM-1 emerges in *Pseudomonas aeruginosa* (PSA) from Australia. **Abstr 47th Intersci Conf antimicrob Agent Chemother.** C1-593. p.75. 2007.
- YONG, D.; TOLEMAN, M.A.; GISKE, C.G.; CHO, H.S.; SUNDMAN, K.; LEE, K.; WALSH, T.R. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla_{NDM-1}, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 53. n.12. p. 5046-54. 2009.
- XIA, Q.; WANG, H.; ZHANG, A.; WANG, T.; ZHANG, Y. Prevalence of 16S rRNA methylase conferring high-level aminoglycoside resistance in *Escherichia coli* in China. **Int J Antimicrob Agents**, v.37, p.387–388, 2011.
- ZARRILLI, R.; POURNARAS, S.; GIANNOULI, M.; TSAKRIS, A. Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. **Int J Antimicrob Agents.** v.41, n.1, p.11-19, 2013.
- ZHOU, Y.; YU, H.; GUO, Q.; XU, X.; YE, X.; WU, S.; GUO, Y.; WANG, M. Distribution of 16S rRNA methylases among different species of Gram-negative bacilli with high-level resistance to aminoglycosides. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** v.29, n.11, p.1349-1353, 2010.

Anexo

Resultados do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos nos cem isolados do estudo e seus respectivos genótipos de resistência.

Cepas	Teste de Sensibilidade por Microdiluição (µg/mL)													Genótipo encontrado	
	CTX	CAZ	FEP	IPM	MEM	SAM	TZP	CIP	PB	COL	TIG	AK	CN	Genes <i>bla</i>	Genes <i>aph</i> e <i>aac</i>
	S ≤ 8 R ≥ 64	S ≤ 8 R ≥ 32	S ≤ 8 R ≥ 32	S ≤ 4 R ≥ 16	S ≤ 4 R ≥ 16	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	S ≤ 16 R ≥ 64	S ≤ 4 R ≥ 16		
Ac 01	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	I (16)	R (>=128)	R (>=4)	R (16)	R (16)	S (1,0)	R	S (<=1,0)	<i>bla</i> OXA-51 like, <i>bla</i> OXA-23 like	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 02	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	I (16)	R (>=128)	R (>=4)	R (6)	R (16)	S (<=0,5)	I	S (<=1,0)	<i>bla</i> OXA-51 like, <i>bla</i> OXA-23 like	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 03	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	I (16)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,5)	S (<=0,5)	S (<=0,5)	I	S (<=1,0)	<i>bla</i> OXA-51 like, <i>bla</i> OXA-23 like	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 04	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	I (16)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,38)	S (<=0,5)	S (2,0)	R	R (>=16)	<i>bla</i> OXA-51 like, <i>bla</i> OXA-23 like	<i>aac(3)-Ia</i> ; <i>aac(6')-Ib</i> ; <i>aph(3')-Ia</i>
Ac 05	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	R (>=32)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,38)	S (<=0,5)	S (<=0,5)	S	R (>=16)	<i>bla</i> OXA-51 like, <i>bla</i> OXA-23 like	<i>aac(3)-Ia</i> ; <i>aac(6')-Ib</i> ; <i>aph(3')-Ia</i>
Ac 06	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)	R	S (2,0)	<i>bla</i> OXA-51 like, <i>bla</i> OXA-23 like	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 08	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	I (16)	R (>=128)	R (>=4)	NT	S (<=0,5)	S (1,0)	R	S (2,0)	<i>bla</i> OXA-51 like, <i>bla</i> OXA-23 like	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 09	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	R (>=32)	R (>=128)	R (>=4)	NT	S (1,0)	S (1,0)	R	S (2,0)	<i>bla</i> OXA-51 like, <i>bla</i> OXA-23 like	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 11	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	R (>=32)	R (>=128)	R (>=4)	NT	S (<=0,5)	S (<=0,5)	R	S (<=1,0)	<i>bla</i> OXA-51 like, <i>bla</i> OXA-23 like	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 12	NT	R	R	R	R	NT	R (>=128)	R	S (0,25)	NT	I (4,0)	R	R	<i>bla</i> OXA-51 like, <i>bla</i> OXA-23 like	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 13	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	R (>=32)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,25)	S (<=0,5)	S (<=0,5)	S	I (8,0)	<i>bla</i> OXA-51 like, <i>bla</i> OXA-23 like	<i>aac(3)-Ia</i> ; <i>aac(6')-Ib</i> ; <i>aph(3')-Ia</i>
Ac 14	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	R (>=32)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,38)	S (<=0,5)	S (<=0,5)	R	S (<=1,0)	<i>bla</i> OXA-51 like, <i>bla</i> OXA-23 like	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 16	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	R (>=32)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,50)	S (<=0,5)	S (<=0,5)	S	I (8,0)	<i>bla</i> OXA-51 like, <i>bla</i> OXA-23 like	<i>aac(3)-Ia</i> ; <i>aac(6')-Ib</i> ; <i>aph(3')-Ia</i>
Ac 17	NT	R	R	R	R	I	R (>=128)	R	S (0,38)	S (<=0,5)	S (<=0,5)	S	S	<i>bla</i> OXA-51 like, <i>bla</i> OXA-23 like	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 18	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	R (>=32)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,25)	S (<=0,5)	S (1,0)	R	S (<=1,0)	<i>bla</i> OXA-51 like, <i>bla</i> OXA-23 like	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 20	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	R (>=32)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,25)	S (<=0,5)	S (1,0)	S	S (<=1,0)	<i>bla</i> OXA-51 like, <i>bla</i> OXA-23 like	-
Ac 21	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	R (>=32)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,25)	S (<=0,5)	S (1,0)	R	S (<=1,0)	<i>bla</i> OXA-51 like, <i>bla</i> OXA-23 like	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 25	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	R (>=32)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,50)	S (<=0,5)	S (2,0)	I	S (4,0)	<i>bla</i> OXA-51 like, <i>bla</i> OXA-23 like	<i>aac(3)-Ia</i> ; <i>aac(6')-Ib</i> ; <i>aph(3')-Ia</i>
Ac 26	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	R (>=32)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,25)	S (<=0,5)	S (2,0)	R	S (4,0)	<i>bla</i> OXA-51 like, <i>bla</i> OXA-23 like	<i>aac(3)-Ia</i> ; <i>aph(3')-Ia</i>
Ac 27	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	I (16)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,38)	S (<=0,5)	S (2,0)	S	R (>=16)	<i>bla</i> OXA-51 like, <i>bla</i> OXA-23 like	<i>aac(3)-Ia</i> ; <i>aac(6')-Ib</i> ; <i>aph(3')-Ia</i>
Ac 29	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	R (>=32)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,25)	S (<=0,5)	S (1,0)	R	S (<=1,0)	<i>bla</i> OXA-51 like, <i>bla</i> OXA-23 like	<i>aph(3')-VI</i> ; <i>aac(6')-Ib</i>
Ac 30	NT	R	R	R	R	NT	R (>=128)	R	S (0,38)	NT	S (0,75)	R	S	<i>bla</i> OXA-51 like, <i>bla</i> OXA-23 like	<i>aph(3')-VI</i> ; <i>aac(6')-Ib</i>
Ac 31	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	R (>=32)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,38)	S (<=0,5)	S (0,5)	S	I (8,0)	<i>bla</i> OXA-51 like, <i>bla</i> OXA-23 like	<i>aac(3)-Ia</i> ; <i>aac(6')-Ib</i> ; <i>aph(3')-Ia</i>
Ac 33	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	NT	R (>=128)	R (>=4)	S (0,25)	NT	S (2,0)	S	S (<=1,0)	<i>bla</i> OXA-51 like, <i>bla</i> OXA-23 like	-
Ac 36	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	I (16)	R (>=128)	R (>=4)	S (1,0)	S (<=0,5)	S (0,5)	R	S (<=1,0)	<i>bla</i> OXA-51 like, <i>bla</i> OXA-23 like	<i>aph(3')-VI</i> ; <i>aac(6')-Ib</i>

AK: Amicacina; CN: Gentamicina; SAM: Ampicilina/Sulbactam; TZP: Piperacilina/Tazobactam; CTX: Cefotaxima; CAZ: Ceftazidima; FEP: Cefepime; 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. NT: antimicrobiano não testado. -: ausência dos genes pesquisados.

Resultados do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos nos cem isolados do estudo e seus respectivos genótipos de resistência.

Cepas	Teste de Sensibilidade por Microdiluição (µg/mL)													Genótipo encontrado	
	CTX	CAZ	FEP	IPM	MEM	SAM	TZP	CIP	PB	COL	TIG	AK	CN	Genes <i>bla</i>	Genes <i>aph</i> e <i>aac</i>
	S ≤ 8 R ≥ 64	S ≤ 8 R ≥ 32	S ≤ 8 R ≥ 32	S ≤ 4 R ≥ 16	S ≤ 4 R ≥ 16	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	S ≤ 16 R ≥ 64	S ≤ 4 R ≥ 16		
Ac 37	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	R (>=32)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,38)	S (<=0,5)	S (2,0)	R	S (4,0)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aph(3')-VI</i> ; <i>aac(6')-Ib</i>
Ac 38	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	R (>=32)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,12)	S (<=0,5)	S (1,0)	S	S (<=1,0)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	-
Ac 39	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	R (>=32)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,50)	S (<=0,5)	S (0,5)	R	S (<=1,0)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aph(3')-VI</i> ; <i>aac(6')-Ib</i>
Ac 40	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	R (>=32)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,50)	S (<=0,5)	S (2,0)	R	R (>=16)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aac(3)-Ia</i> ; <i>aac(6')-Ib</i> ; <i>aph(3')-Ia</i>
Ac 41	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	I (16)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,19)	S (<=0,5)	I (4,0)	R	R (>=16)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aac(3)-Ia</i> ; <i>aac(6')-Ib</i> ; <i>aph(3')-Ia</i>
Ac 43	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	R (>=32)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,38)	S (<=0,5)	S (0,5)	S	I (8,0)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aac(3)-Ia</i> ; <i>aac(6')-Ib</i>
Ac 44	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	R (>=32)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,38)	S (<=0,5)	S (0,5)	R	S (<=1,0)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aac(3)-Ia</i> ; <i>aph(3')-VI</i>
Ac 45	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	S (8,0)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,50)	S (<=0,5)	S (2,0)	R	I (8,0)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aac(6')-Ib</i>
Ac 47	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	R (>=32)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,25)	S (<=0,5)	S (1,0)	R	S (<=1,0)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 48	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	I (16)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,50)	S (<=0,5)	S (0,5)	R	S (<=1,0)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aph(3')-VI</i> ; <i>aac(6')-Ib</i>
Ac 49	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	R (>=32)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,38)	S (<=0,5)	S (0,5)	I	I (8,0)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aac(3)-Ia</i> ; <i>aac(6')-Ib</i> ; <i>aph(3')-Ia</i>
Ac 50	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	R (>=32)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,38)	S (<=0,5)	S (1,0)	R	S (4,0)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aac(3)-Ia</i> ; <i>aac(6')-Ib</i> ; <i>aph(3')-Ia</i>
Ac 51	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	I (16)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,25)	S (<=0,5)	S (2,0)	R	R (>=16)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aac(6')-Ib</i>
Ac 52	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	R (>=32)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,50)	S (<=0,5)	S (0,5)	R	S (2,0)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 53	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	R (>=32)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,38)	S (1,0)	S (0,5)	R	S (2,0)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 54	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	R (>=32)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,19)	S (<=0,5)	S (0,5)	R	S (<=1,0)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 57	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	R (>=32)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,38)	S (<=0,5)	S (1,0)	R	S (<=1,0)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 58	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	I (16)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,38)	S (<=0,5)	S (<=0,5)	R	R (>=16)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aac(3)-Ia</i> ; <i>aac(6')-Ib</i> ; <i>aph(3')-Ia</i>
Ac 59	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)	R	S (<=1,0)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 61	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	I (16)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,38)	S (<=0,5)	S (2,0)	R	S (4,0)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 62	NT	R	R	R	R	NT	R	R	S (0,38)	S (<=0,5)	S (<=0,5)	R	I	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 63	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	I (16)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,5)	S (<=0,5)	S (<=0,5)	R	S (<=1,0)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 64	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	I (16)	R (>=128)	R (>=4)	NT	S (<=0,5)	S (1,0)	R	R (>=16)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aac(3)-Ia</i> ; <i>aac(6')-Ib</i> ; <i>aph(3')-Ia</i>
Ac 65	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	R (>=32)	R (>=128)	R (>=4)	NT	S (1,0)	S (1,0)	R	S (<=1,0)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 67	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	I (16)	R (>=128)	R (>=4)	NT	S (<=0,5)	S (<=0,5)	R	R (>=16)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	-

AK: Amicacina; CN: Gentamicina; SAM: Ampicilina/Sulbactam; TZP: Piperacilina/Tazobactam; CTX: Cefotaxima; CAZ: Ceftazidima; FEP: Cefepime; 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. NT: antimicrobiano não testado. -: ausência dos genes pesquisados.

Resultados do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos nos cem isolados do estudo e seus respectivos genótipos de resistência.

Cepas	Teste de Sensibilidade por Microdiluição (µg/mL)													Genótipo encontrado	
	CTX	CAZ	FEP	IPM	MEM	SAM	TZP	CIP	PB	COL	TIG	AK	CN	Genes <i>bla</i>	Genes <i>aph</i> e <i>aac</i>
	S ≤ 8 R ≥ 64	S ≤ 8 R ≥ 32	S ≤ 8 R ≥ 32	S ≤ 4 R ≥ 16	S ≤ 4 R ≥ 16	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	S ≤ 16 R ≥ 64	S ≤ 4 R ≥ 16		
Ac 68	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	S (8,0)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,25)	NT	I (4,0)	S	S (<=1,0)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	-
Ac 69	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	R (>=32)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,25)	S (<=0,5)	S (<=0,5)	R	S (<=1,0)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 70	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	R (>=32)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,38)	S (<=0,5)	S (<=0,5)	S	S (<=1,0)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aac(3)-Ia</i> ; <i>aac(6')-Ib</i> ; <i>aph(3')-Ia</i>
Ac 71	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	NT	R (>=128)	R (>=4)	S (0,50)	S (<=0,5)	S (<=0,5)	R	R (>=16)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aac(6')-Ib</i> ; <i>aph(3')-Ia</i>
Ac 72	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	I (16)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,38)	S (<=0,5)	S (<=0,5)	R	R (>=16)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aac(3)-Ia</i> ; <i>aac(6')-Ib</i>
Ac 73	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	I (16)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,25)	S (<=0,5)	S (1,0)	R	S (<=1,0)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 77	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	R (>=32)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,25)	S (<=0,5)	S (1,0)	R	S (4,0)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 78	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	R (>=32)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,25)	S (<=0,5)	S (1,0)	S	I (8,0)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aac(3)-Ia</i> ; <i>aac(6')-Ib</i> ; <i>aph(3')-Ia</i>
Ac 80	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	R (>=32)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,50)	S (<=0,5)	S (2,0)	S	S (<=1,0)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	-
Ac 81	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	I (16)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,25)	S (<=0,5)	S (2,0)	R	R (>=16)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aac(6')-Ib</i>
Ac 82	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	R (>=32)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,38)	S (<=0,5)	S (2,0)	R	S (<=1,0)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aph(3')-VIa</i> ; <i>aac(6')-Ib</i>
Ac 83	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	R (>=32)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,25)	S (<=0,5)	S (1,0)	R	R (>=16)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aac(3)-Ia</i> ; <i>aac(6')-Ib</i> ; <i>aph(3')-Ia</i>
Ac 85	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	R (>=32)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,38)	NT	S (0,75)	S	S (<=1,0)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	-
Ac 86	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	I (16)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,38)	S (<=0,5)	S (0,5)	S	R (>=16)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aac(3)-Ia</i> ; <i>aac(6')-Ib</i> ; <i>aph(3')-Ia</i>
Ac 89	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	I (16)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,25)	NT	S (2,0)	S	S (<=1,0)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	-
Ac 90	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	R (>=32)	R (>=128)	R (>=4)	S (1,0)	S (<=0,5)	S (0,5)	S	S (<=1,0)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	-
Ac 92	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	R (>=32)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,38)	S (<=0,5)	S (2,0)	S	S (<=1,0)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	-
Ac 93	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	I (16)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,12)	S (<=0,5)	S (1,0)	R	S (<=1,0)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aph(3')VI</i> ; <i>aac(6')Ib</i>
Ac 95	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	R (>=32)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,50)	S (<=0,5)	S (0,5)	I	S (<=1,0)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 96	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	R (>=32)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,50)	S (<=0,5)	S (2,0)	R	S (<=1,0)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 97	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	R (>=32)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,19)	S (<=0,5)	I (4,0)	R	S (4,0)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aph(3')-VI</i> ; <i>aac(6')-Ib</i>
Ac 100	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	I (16)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,80)	S (<=0,5)	S (2,0)	R	S (2,0)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aph(3')-VI</i> ; <i>aac(6')-Ib</i>
Ac 101	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	R (>=32)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,25)	S (<=0,5)	S (1,0)	R	S (<=1,0)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aac(6')-Ib</i>
Ac 105	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	R (>=32)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,38)	S (<=0,5)	S (0,50)	R	S (<=1,0)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 106	NT	R	R	R	R	R (>=32)	R	R	S (0,125)	NT	S (1,0)	R	S	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aph(3')-VI</i> ; <i>aac(6')-Ib</i>

AK: Amicacina; CN: Gentamicina; SAM: Ampicilina/Sulbactam; TZP: Piperacilina/Tazobactam; CTX: Cefotaxima; CAZ: Ceftazidima; FEP: Cefepime; 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. NT: antimicrobiano não testado. -: ausência dos genes pesquisados.

Resultados do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos nos cem isolados do estudo e seus respectivos genótipos de resistência.

Cepas	Teste de Sensibilidade por Microdiluição (µg/mL)													Genótipo encontrado	
	CTX	CAZ	FEP	IPM	MEM	SAM	TZP	CIP	PB	COL	TIG	AK	CN	Genes <i>bla</i>	Genes <i>aph</i> e <i>aac</i>
	S ≤ 8 R ≥ 64	S ≤ 8 R ≥ 32	S ≤ 8 R ≥ 32	S ≤ 4 R ≥ 16	S ≤ 4 R ≥ 16	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	S ≤ 16 R ≥ 64	S ≤ 4 R ≥ 16		
Ac 109	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	I (16)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,75)	S (<=0,5)	S (0,5)	I	S (<=1,0)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 110	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	R (>=32)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,19)	S (<=0,5)	S (1,0)	S	S (<=1,0)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	-
Ac 112	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	I (16)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,38)	S (1,0)	S (1,0)	R	S (<=1,0)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 114	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	I (16)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,38)	S (<=0,5)	I (4,0)	R	R (>=16)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aac(3)-Ia</i> ; <i>aac(6')-Ib</i> ; <i>aph(3')-Ia</i>
Ac 115	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	R (>=32)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,38)	S (<=0,5)	S (0,50)	S	S (<=1,0)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aac(3)Ia</i>
Ac 116	NT	R	R	R	R	I (16)	R	R	S (0,50)	S (<=0,5)	I (4,0)	I	R	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aac(6')Ib</i>
Ac 118	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	I (16)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,19)	S (<=0,5)	I (4,0)	R	R (>=16)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aac(3)-Ia</i> ; <i>aph(3')-VI</i>
Ac 119	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	R (>=32)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,38)	S (<=0,5)	S (0,5)	S	I (8,0)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aac(3)-Ia</i> ; <i>aph(3')-Ia</i>
Ac 120	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	I (16)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,38)	S (<=0,5)	S (0,5)	R	S (2,0)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aph(3')-VI</i> ; <i>aac(6')-Ib</i>
Ac 123	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	R (>=32)	R (>=128)	R (>=4)	S (1,50)	S (<=0,5)	S (0,5)	R	S (<=1,0)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aph(3')-VI</i> ; <i>aac(6')-Ib</i>
Ac 127	NT	R	R	R	R	NT	R	R	S (0,25)	NT	NT	I	R	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aac(3)-Ia</i> ; <i>aac(6')-Ib</i> ; <i>aph(3')-Ia</i>
Ac 128	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	R (>=32)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,50)	S (<=0,5)	S (1,0)	R	S (4,0)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 130	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	R (>=32)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,50)	S (<=0,5)	S (0,5)	R	S (<=1,0)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aph(3')-VI</i> ; <i>aac(6')-Ib</i>
Ac 131	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	I (16)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,50)	S (<=0,5)	I (4,0)	R	R (>=16)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aac(3)-Ia</i> ; <i>aac(6')-Ib</i> ; <i>aph(3')-Ia</i>
Ac 133	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	R (>=32)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,5)	S (1,0)	I (4,0)	R	S (2,0)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 134	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	R (>=32)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,25)	S (<=0,5)	S (1,0)	R	S (<=1,0)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aph(3')-VI</i> ; <i>aac(6')-Ib</i>
Ac 137	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	R (>=32)	R (>=128)	R (>=4)	S (1,0)	S (<=0,5)	S (2,0)	R	S (4,0)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 138	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)	R	S (2,0)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aph(3')-VI</i> ; <i>aac(6')-Ib</i>
Ac 139	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	R (>=32)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,5)	S (<=0,5)	S (1,0)	S	I (8,0)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aac(3)-Ia</i>
Ac 145	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	I (16)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,5)	S (<=0,5)	I (4,0)	S	R (>=16)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aac(3)-Ia</i> ; <i>aac(6')-Ib</i>
Ac 146	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	R (>=32)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,25)	S (<=0,5)	S (0,5)	R	S (<=1,0)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 147	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	I (16)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,50)	S (<=0,5)	S (0,5)	R	S (<=1,0)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 148	NT	R	R	R	R	I (16)	R	R	S (0,50)	S (<=0,5)	S (0,5)	R	S	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aph(3')-VI</i>
Ac 149	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	R (>=32)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,38)	S (<=0,5)	I (4,0)	R	R (>=16)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aac(3)-Ia</i> ; <i>aac(6')-Ib</i> ; <i>aph(3')-Ia</i>
Ac 150	R (>=64)	R (>=64)	R (>=64)	R (>=16)	R (>=16)	S (8,0)	R (>=128)	R (>=4)	S (0,50)	S (<=0,5)	I (4,0)	R	S (<=1,0)	<i>bla</i> _{OXA-51 like} , <i>bla</i> _{OXA-23 like}	<i>aph(3')-VI</i> ; <i>aac(6')-Ib</i>

AK: Amicacina; CN: Gentamicina; SAM: Ampicilina/Sulbactam; TZP: Piperacilina/Tazobactam; CTX: Cefotaxima; CAZ: Ceftazidima; FEP: Cefepime; 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. NT: antimicrobiano não testado. -: ausência dos genes pesquisados.

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 12/03/2014

Assinatura