

**GISELLE DALL' CORTIVO**

**AVALIAÇÃO DOS PERFIS FENOTÍPICO E GENOTÍPICO DO COMPLEXO  
*ACINETOBACTER BAUMANNII* - *CALCOACETICUS* RESISTENTE AOS  
CARBAPENÊMICOS NO AMBIENTE HOSPITALAR**

JOINVILLE  
2014

**Definição de estilo:** Sumário 3: Fonte: (Padrão) Arial, Não verificar ortografia ou gramática, Recuo: À esquerda: 0 cm, Tabulações: 15,98 cm, Direita, Preenchimento: ...

**GISELLE DALL' CORTIVO**

**AVALIAÇÃO DOS PERFIS FENOTÍPICO E GENOTÍPICO DO COMPLEXO  
*ACINETOBACTER BAUMANNII* - *CALCOACETICUS* RESISTENTE AOS  
CARBAPENÊMICOS NO AMBIENTE HOSPITALAR**

Dissertação de mestrado apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente, na Universidade da Região de Joinville. Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França

JOINVILLE  
2014

Formatado: À esquerda

[Catalogação na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille](#)

Cortivo, Giselle Dall'  
C829a Avaliação dos perfis fenotípico e genotípico do complexo acinetobacter baumannii –  
calcoaceticus resistente aos carbapenêmicos no ambiente hospitalar / Giselle Dall' Cortivo ;  
orientador Dr. Paulo Henrique Condeixa de França – Joinville: UNIVILLE, 2014.

66 f. : il. tab.graf : 30 cm

Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente – Universidade da Região de Joinville)

1. Acinetobacter baumannii. 2. Bactérias. 3. Agentes anti-infecciosos – Resistência. 4.  
Antibióticos Carbapenêmicos. I. França, Paulo Henrique Condeixa de (orient.). II. Título.

CDD 615.329

## TERMO DE APROVAÇÃO

Giselle Dall' Cortivo

### **AVALIAÇÃO DOS PERFIS FENOTÍPICO E GENOTÍPICO DO COMPLEXO *ACINETOBACTER BAUMANNII* - *CALCOACETICUS* RESISTENTE AOS CARBAPENÊMICOS NO AMBIENTE HOSPITALAR**

Dissertação julgada para obtenção do título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente e aprovada em sua forma final pelo Programa de Mestrado em Saúde e Meio Ambiente da Universidade da Região de Joinville. Área de concentração (Saúde).  
Aprovada em \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2014.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Orientador Paulo Henrique Condeixa de França (UNIVILLE)

Prof. Dr. Glauco Adrieno Westphal, membro interno (UNIVILLE)

Dra. Elizabeth Harummy Takagi, membro externo (Instituto Adolfo Lutz)

Joinville, 18 de março de 2014.

**Dedico este trabalho aos meus pais  
Derly e Sônia pelo eterno incentivo.  
*Amor, respeito e admiração eternos.***

## **AGRADECIMENTOS**

À meu orientador Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França por me receber no Laboratório de Biologia Molecular, pela sua extrema dedicação, disponibilidade e confiança depositada. Muito obrigada.

À equipe do laboratório de Biologia Molecular em especial Leslie Ecker Ferreira, Andréia Gutberlet e Jéssica Agustini por todo apoio, dedicação e ajuda.

À professora Roseneide Campos pelo grande incentivo, conselhos e orientações durante o trabalho.

As instituições de saúde que cederam os isolados clínicos para realização deste trabalho.

Aos meus queridos colegas de turma e hoje amigos Graziela, Lorenza, Leonardo e Willian pelo companherismo.

Aos meus colegas e amigos de trabalho Robson e Magna pela compreensão, carinho e força.

Aos meus queridos amigos que sempre estiveram ao meu lado.

À minha família pelo amor, carinho e grande incentivo e a qual eu dedico todas as minhas conquistas.

## RESUMO

A partir da década de 1980, o complexo *Acinetobacter baumannii* - *calcoaceticus* tornou-se preocupante no ambiente hospitalar devido sua notável capacidade de desenvolver resistência a várias classes de antimicrobianos comumente utilizados na clínica médica. Os antibióticos carbapenêmicos representam a terapêutica indicada para o tratamento de infecções graves causadas pelo complexo. Porém, vários são os mecanismos que conferem resistência aos carbapenêmicos, sendo a produção de  $\beta$ -lactamases da classe D de Ambler (OXA-carbapenemases) o mecanismo mais prevalente. A identificação e interpretação correta dos fatores que contribuem para o desenvolvimento da resistência são essenciais na definição terapêutica e auxiliam à compreensão da epidemiologia dos surtos, pois permitem o estabelecimento do grau de similaridade entre diferentes isolados clínicos, a identificação de transmissão cruzada, o monitoramento e controle das infecções hospitalares. No Hospital Regional Hans Dieter Schmidt (HRHDS), em Joinville - SC, foram confirmados 139 isolados clínicos do complexo *A. baumannii* - *calcoaceticus* resistentes aos carbapenêmicos (CRAb) no período entre janeiro de 2010 e dezembro de 2013, destacando-se os meses de junho e dezembro de 2011, nos quais foram caracterizados surtos causados por este patógeno. O presente estudo objetivou avaliar os perfis fenotípico e genotípico do complexo *A. baumannii* - *calcoaceticus* causador de infecções relacionada à assistência à saúde no HRHDS. Os dados do perfil de suscetibilidade aos carbapenêmicos correspondentes ao período 2010 a 2013 foram coletados junto ao Serviço de Controle de Infecção Hospitalar da instituição. Para as avaliações fenotípicas e genotípicas foram utilizados 118 isolados clínicos identificados em uma variedade de sítios anatômicos e setores do hospital, obtidos entre junho de 2011 e agosto de 2013. Foram considerados resistentes a imipenem e meropenem os isolados que apresentaram halo de inibição  $\leq 13$  mm via disco difusão e concentração inibitória mínima (MIC)  $\geq 16$   $\mu\text{g/mL}$  utilizando-se Etest<sup>®</sup>. A investigação conjunta da presença de cinco famílias de genes codificantes de oxacilinas - *bla*<sub>OXA-23-like</sub>, *bla*<sub>OXA-24-like</sub>, *bla*<sub>OXA-51-like</sub>, *bla*<sub>OXA-58-like</sub> e *bla*<sub>OXA-143</sub> foi realizada via Multiplex PCR. A maioria dos isolados (87,3%) apresentou os genes *bla*<sub>OXA-23-like</sub> e *bla*<sub>OXA-51-like</sub> simultaneamente, enquanto três (2,5%) apresentaram apenas o gene *bla*<sub>OXA-51-like</sub>. Ambos os grupos apresentaram MIC  $\geq 16$   $\mu\text{g/mL}$  para imipenem e meropenem. Nenhum dos isolados apresentou os genes *bla*<sub>OXA-24-like</sub>, *bla*<sub>OXA-58-like</sub> e *bla*<sub>OXA-143</sub>. Em 2011 foram identificados 22 isolados CRAb, correspondendo a 84,6% das amostras avaliadas. Em 2012 e 2013, os isolados CRAb aumentaram para 64 (96,9%) e 53 (98,1%), respectivamente. Os isolados referentes aos surtos não diferiram dos demais quanto às características avaliadas. Observou-se o surgimento de cepas com suscetibilidade intermediária à tigeciclina, alcançando sete (10,9%) e oito (15,1%) isolados em 2012 e 2013, respectivamente, além de três (5,7%) isolados resistentes em 2013. Os isolados apresentando sensibilidade intermediária ou completa à tigeciclina não diferiram quanto a ocorrência dos genes *bla*<sub>OXA-23-like</sub> e *bla*<sub>OXA-51-like</sub>. Em conclusão, o levantamento do perfil de suscetibilidade aos carbapenêmicos realizado aponta o progressivo aumento da circulação de isolados CRAb no período avaliado. Com base nos resultados obtidos, sugere-se a ocorrência de ampla disseminação longitudinal e transversal de CRAb no HRHDS, indicando a necessidade de revisão de medidas de prevenção e controle de surtos de modo a torná-las mais eficazes.

Palavras-chave: *Acinetobacter baumannii*, resistência bacteriana, carbapenêmicos.

## ABSTRACT

From the 1980s, the *Acinetobacter baumannii* - *calcoaceticus* complex became a major concern in health care settings due to its remarkable ability to develop resistance to several classes of antimicrobial agents commonly used in clinical practice. The antibiotics known as carbapenems are the therapy of choice for treating severe infections caused by the complex. The synthesis of Ambler class D  $\beta$ -lactamases (OXA-carbapenemases) is the most prevalent mechanism that confers resistance to carbapenems. The identification and correct interpretation of factors that contribute to resistance development are essential for the therapeutic setting and may assist the understanding of the epidemiology of outbreaks, as they allow the establishment of similarity degrees among diverse clinical isolates, the identification of cross transmission, and the monitoring and control of nosocomial infections. At the Hospital Regional Hans Dieter Schmidt (HRHDS) in Joinville - SC, 139 clinical isolates were confirmed as *A. baumannii* - *calcoaceticus* complex resistant to carbapenems (CRAb) in the period between January 2010 and December 2013, highlighting the months of June and December 2011 which had outbreaks caused by this pathogen. The present study aimed to evaluate the phenotypic and genotypic profiles of the *A. baumannii* - *calcoaceticus* complex related to health care infections in HRHDS. The data of susceptibility profile to carbapenems from 2010 to 2013 were collected at the Service of Nosocomial Infection Control of the institution. For phenotypic and genotypic assessments, 118 clinical isolates, identified in a variety of anatomical sites and hospital sectors between June 2011 and August 2013, were employed. The isolates that showed an inhibition zone  $\leq 13$  mm by disk diffusion and minimum inhibitory concentration (MIC)  $\geq 16$   $\mu\text{g/mL}$  using Etest<sup>®</sup> were considered resistant to imipenem and meropenem. The investigation of the presence of five families of genes encoding oxacillinases, namely *bla*<sub>OXA-23-like</sub>, *bla*<sub>OXA-24-like</sub>, *bla*<sub>OXA-51-like</sub>, *bla*<sub>OXA-58-like</sub>, and *bla*<sub>OXA-143</sub>, was performed by multiplex PCR. Most isolates (87,3%) carried *bla*<sub>OXA-23-like</sub> and *bla*<sub>OXA-51-like</sub> genes simultaneously, whereas three isolates (2,5%) harbored only the gene *bla*<sub>OXA-51-like</sub>. Both groups showed MIC  $\geq 16$   $\mu\text{g/mL}$  for imipenem and meropenem. None of the isolates contained *bla*<sub>OXA-24-like</sub>, *bla*<sub>OXA-58-like</sub>, and *bla*<sub>OXA-143</sub> genes. In 2011, 22 CRAb isolates were identified, corresponding to 84,6% of the samples. In 2012 and 2013, the number of CRAb isolates increased to 64 (96,9%) and 53 (98,1%), respectively. Isolates related to outbreaks did not differ from the others as to the characteristics evaluated. We observed the emergence of strains with intermediate susceptibility to tigecycline, reaching seven (10,9%) and eight (15,1%) isolates in 2012 and 2013, respectively, besides three (5,7%) resistant isolates in 2013. The isolates with intermediate or full susceptibility to tigecycline did not differ on the occurrence of *bla*<sub>OXA-23-like</sub> and *bla*<sub>OXA-51-like</sub> genes. In conclusion, the investigation of the susceptibility profile to carbapenems pointed an increasing circulation of CRAb during the study period. Taken together, our results suggest an extensive dissemination of CRAb isolates in HRHDS and warn the need for a systematic review of measures for prevention and control of outbreaks in order to make them more effective.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, antibiotic resistance, carbapenems.



## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1 – Iniciadores utilizados na detecção dos genes codificantes de oxacilinases.....30

Figura 1 - Perfis eletroforéticos correspondentes à detecção dos genes (1) *bla*<sub>oxa-58-like</sub>, (2) *bla*<sub>oxa-23-like</sub>, (3) *bla*<sub>oxa-51-like</sub>, (4) *bla*<sub>oxa-24-like</sub> e (5) *bla*<sub>oxa-143</sub> através da técnica Multiplex PCR.....31

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFLP – *Amplified fragment length polymorphism*  
AP-PCR – *Arbitrarily primed-polymerase chain reaction*  
ATCC – *American Type Culture Collection* CIM – Concentração Inibitória Mínima  
CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*  
CRAb – Complexo *Acinetobacter baumannii* - *calcoaceticus* resistente aos carbapenêmicos  
CTI – Centro de terapia intensiva  
DNA – *Deoxyribonucleic Acid*/Ácido Desoxirribonucleico  
ERIC – *Enterobacterial repetitive intergenic consensus*  
ESBL – Beta-lactamase de espectro estendido  
EUA – Estados Unidos da América  
FDA – *Food and Drug Administration*/Administração de Comidas e medicamentos  
HRHDS – Hospital Regional Hans Dieter Schmidt  
IRAS – Infecção relacionada à assistência à saúde  
MDR – *Multidrug resistant*/Resistência a várias drogas  
MBL - Metalo beta-lactamase  
Pb – Pares de bases  
PBP – Proteínas ligadoras de penicilinas  
PCR – *Polymerase chain reaction* /Reação em Cadeia da Polimerase  
PFGE – *Pulsed-field gel electrophoresis*/ Eletroforese em Gel de Campo Pulsado  
REP – *Repetitive extragenic palindromic sequence*  
RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism* /Análise de Polimorfismo de Comprimentos de Fragmentos de Restrição  
SCIH – Serviço de Controle de Infecção Hospitalar

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b><u>1211</u></b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b><u>1413</u></b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	<u>1413</u>
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	<u>1413</u>
<b>3 REVISÃO</b> .....	<b><u>1514</u></b>
3.1 O GÊNERO ACINETOBACTER .....	<u>1514</u>
3.2 O COMPLEXO ACINETOBACTER BAUMANNII - CALCOACETICUS .....	<u>1615</u>
3.2.1 Epidemiologia das infecções causadas por <i>A. baumannii</i> .....	<u>1615</u>
3.2.2 Fatores de risco à infecção .....	<u>1817</u>
3.2.3 Identificação laboratorial .....	<u>1918</u>
3.2.3.1 Identificação fenotípica .....	<u>1918</u>
3.2.3.2 Identificação genotípica .....	<u>2019</u>
3.2.4 Antimicrobianos utilizados no tratamento das infecções causadas por <i>A. baumannii</i> .....	<u>2221</u>
3.3 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS .....	<u>2423</u>
3.3.1 Resistência aos beta-lactâmicos .....	<u>2423</u>
3.3.1.1 Resistência aos carbapenêmicos .....	<u>2423</u>
3.3.1.1.1 Oxacilinases .....	<u>2524</u>
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	<b><u>2726</u></b>
4.1 TIPO DE PESQUISA .....	<u>2726</u>
4.2 PERÍODO DA PESQUISA E SELEÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS .....	<u>2726</u>
4.3 AVALIAÇÃO EVOLUTIVA DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE .....	<u>2726</u>
4.4 LOCAIS DA PESQUISA .....	<u>2726</u>
4.5 IDENTIFICAÇÃO E MANUTENÇÃO DOS ISOLADOS .....	<u>2827</u>

	4.6 ANÁLISE DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS .....	<del>28</del> 27
	4.6.1 Métodos fenotípicos .....	<del>28</del> 27
	4.6.2 Métodos genotípicos .....	<del>29</del> 28
	4.6.2.1 Obtenção de DNA microbiano .....	<del>29</del> 28
	4.6.2.2 Avaliação da viabilidade do DNA microbiano.....	29
	4.6.2.3 Identificação de marcadores genéticos associados a carbapenemases.....	29
	4.6.2.4 Eletroforese.....	30
	4.7 ASPECTOS ÉTICOS.....	<del>32</del> 31
	<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b><del>33</del>32</b>
	<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b><del>55</del>54</b>
	<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b><del>56</del>55</b>
	ANEXO A – Setores e respectivos números de leitos do Hospital Regional Hans Dieter Schidt .....	<del>64</del> 63
	APÊNDICE A – Relação dos isolados identificados, o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos e presença das oxacilinases .....	<del>65</del> 64

## 1 INTRODUÇÃO

O uso abusivo de antimicrobianos e a quebra de rotinas padrão para higienização das mãos são responsabilizados pela emergência e disseminação de patógenos multirresistentes no ambiente hospitalar. Apesar das medidas de prevenção, as infecções associadas à ventilação mecânica ainda são comuns no Centro de Terapia Intensiva (CTI), pois os pacientes são expostos a diversos medicamentos, à microbiota dos profissionais e à ruptura de barreiras cutâneas e mucosas, favorecendo a colonização microbiana, a possibilidade de desequilíbrio imunológico e a probabilidade de infecções (CASTELO et al., 2013; CHANG et al., 2011; LEMOS et al., 2011).

A rápida adaptação do gênero bacteriano *Acinetobacter* spp. no ambiente hospitalar e o desenvolvimento de diferentes mecanismos de resistências a uma vasta gama de antimicrobianos constitui grande preocupação nos hospitais. (DOUGHARI et al., 2011). A ocorrência de infecção hospitalar por membros do complexo *A. baumannii* – *calcoaceticus* ou outros microrganismos oportunistas depende da existência de uma fonte do agente, da sua transmissão e da suscetibilidade do paciente (EL-AGEERY et al., 2012). O complexo *A. baumannii* – *calcoaceticus* é composto por quatro genospecies distintas, a saber: *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. pittii* e *A. nosocomialis* (NEMEC et al., 2011; PELEG et al., 2008).

A suscetibilidade aos antimicrobianos é consideravelmente diferente entre países, localidades e até setores de um mesmo hospital. Uma vez detectada a resistência múltipla em áreas específicas, intervenções devem ser adotadas para reduzir sua frequência e evitar novos casos. As diferenças de padrões de resistência em amostras clínicas enfatizam a importância de investigações locais para determinar a terapia mais adequada (CARNEIRO e SARIDAKIS, 2008; PONTES et al., 2006).

Os antibióticos carbapenêmicos representam a terapêutica de escolha para o tratamento de infecções graves causadas pelo complexo *A. baumannii* – *calcoaceticus*. Porém, vários são os mecanismos de resistência relacionados ao gênero *Acinetobacter* spp., como hidrólise por beta-lactamases, alteração na permeabilidade da membrana externa, redução da afinidade dos antibióticos pelas

proteínas ligadoras de penicilina (PBPs) e aumento da atividade de bombas de efluxo, sendo a produção de  $\beta$ -lactamases da classe B (metalo beta-lactamases) e da classe D (OXA-Carbapenemases) os mecanismos mais prevalentes (GOOTZ et al., 2008; HIGGINS et al., 2009).

Polimixina B e tigeciclina têm se tornado opções terapêuticas para *Acinetobacter* resistente aos carbapenêmicos. Entretanto, alguns estudos têm demonstrado elevação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) destes antimicrobianos para isolados de *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos (CRAb), limitando ainda mais as alternativas de tratamento (PELEG et al., 2008; HERNÁNDES – TORRES et al., 2010).

Os métodos de tipagem molecular são fundamentais para a compreensão da epidemiologia dos surtos, pois permitem o estabelecimento do grau de similaridade entre diferentes isolados clínicos, auxiliando na confirmação diagnóstica, na identificação de transmissão cruzada e no monitoramento e controle da infecção hospitalar. Além disso, é possível avaliar a relação genética entre isolados clínicos e recuperados do ambiente, evidenciando-se a disseminação interinstitucional de grupos clonais (SINGH et al., 2006).

Assim, a elevação da frequência de infecções nosocomiais atribuídas ao gênero *Acinetobacter* spp. tornou-se um grave problema de saúde pública. A detecção inequívoca dos fatores de resistência, o aumento da compreensão sobre a epidemiologia e sua disseminação são fundamentais para a tomada de decisões na prevenção das infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a suscetibilidade aos antimicrobianos e pesquisar os genes do tipo OXA do complexo *Acinetobacter baumannii* – *calcoaceticus* causador de infecção relacionada à assistência à saúde (IRAS) no Hospital Regional Hans Dieter Schmidt.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Levantar a incidência de isolados clínicos do complexo *A. baumannii* – *calcoaceticus* resistentes aos antibióticos carbapenêmicos associados à IRAS no período 2010 a 2013;
- Avaliar a evolução temporal do perfil fenotípico de resistência de isolados clínicos do complexo *A. baumannii* - *calcoaceticus* aos principais antibióticos no período destacado;
- Investigar a ocorrência de cepas portadoras de genes codificantes para oxacilinases (*bla*<sub>OXA-23-like</sub>, *bla*<sub>OXA-24-like</sub>, *bla*<sub>OXA-51-like</sub>, *bla*<sub>OXA-58-like</sub> e *bla*<sub>OXA-143</sub>) em isolados clínicos do complexo *A. baumannii* - *calcoaceticus* resistentes aos antibióticos carbapenêmicos;
- Analisar a evolução temporal de isolados clínicos do complexo *A. baumannii* – *calcoaceticus* portadores de gene(s) codificante(s) para oxacilinase(s).

### 3 REVISÃO

#### 3.1 O GÊNERO *ACINETOBACTER*

O gênero bacteriano *Acinetobacter* foi definido primeiramente por Brisou & Prevot em 1954, sendo designado como pertencente ao grupo *Achromobacter immobiles*. Em 1974, no Manual de Bacteriologia Bergey, foi sugerida e nomeada uma única espécie pertencente ao gênero: *Acinetobacter calcoaceticus* (BOUVET & GRIMONT, 1986).

Microrganismos do gênero *Acinetobacter* spp. caracterizam-se como cocobacilos Gram negativos, não fermentadores de glicose, aeróbios estritos, catalase positivos, imóveis e oxidase negativos, com bom crescimento em ágar sangue e ágar MacConkey (BROWN et al., 2006). Seu hábitat natural é a água e solo em climas temperados, colonizando a pele de cerca de 0,5% dos humanos saudáveis e, mais raramente, os tratos respiratório e gastrointestinal (KARAGEORGOPOULOS et al., 2008; PELEG et al., 2008).

Uma de suas características mais relevantes é a capacidade de formar biofilme, a qual está diretamente relacionada com o aumento da resistência aos antimicrobianos. A produção de biofilme pode promover a colonização de superfícies e equipamentos e propicia maior adesão às células epiteliais do trato respiratório, assim como o aumento da incidência de infecções relacionadas ao uso de dispositivos invasivos (LEE et al., 2008; RAO et al., 2008).

A classificação taxonômica tem sofrido modificações significativas nos últimos anos. Em 1986, Bouvet e Grimont estabeleceram a existência de 12 genospecies distintas por meio de técnicas de hibridização de DNA bacteriano, sendo atribuída a designação de espécie a apenas seis genospecies – 1, 2, 4, 5, 7 e 8, respectivamente denominadas *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. haemolyticus*, *A. junii*, *A. johnsonii* e *A. lowffii* (DOLZANI et al., 1995; SEIFERT et al., 1997). A partir desta classificação, novas espécies foram identificadas e nomeadas nos anos seguintes, como *A. radioresistens*, isolada primeiramente no solo, correspondente à genospecies 12 (NISHIMURA et al., 1988).



Com base em estudos subsequentes, 20 espécies do gênero foram descritas, incluindo oito espécies de origem humana, sendo *A. parvus*, *A. schindleri*, *A. ursingii*, *A. beijerinckii*, *A. bereziniae*, *A. gyllenbergii*, *A. nosocomialis* e *A. pittii* (NEMEC et al., 2003; NEMEC et al., 2009; NEMEC et al., 2010; NEMEC et al., 2011), e 12 espécies isoladas do meio ambiente (recuperadas a partir de plantas, esgotos e resíduos químicos), a saber *A. baylyi*, *A. bouvetii*, *A. grimontii*, *A. tjernbergiae*, *A. townneri*, *A. tandoii*, *A. gernerii*, *A. brisouii*, *A. indicus*, *A. rudis*, *A. soli* e *A. venetianus*, aumentando o número de espécies descritas para 31, das quais 20 espécies foram reconhecidas e nomeadas (ANANDHAM et al., 2010; CARR et al., 2003; HIDRI, 2012; KIM et al., 2012; MALHOTRA et al., 2012; VANECHOUTTE et al., 2009; VAZ-MOREIRA et al., 2011).

Ao longo dos anos, vários estudos levaram à descoberta de 34 espécies com nomes oficialmente reconhecidos e 25 genospecies pré-definidas (DIJKSHOORN et al., 2007). A espécie mais recentemente descrita foi denominada *A. boissieri*, a qual foi isolada a partir do néctar de plantas (ÁLVAREZ-PÉREZ et al., 2013).

### 3.2 O COMPLEXO *ACINETOBACTER BAUMANNII* - *CALCOACETICUS*

Com base nesta nova classificação, *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, genospecies 3 e genospecies 13TU são difíceis de diferenciar por meio da análise exclusiva das características fenotípicas, sendo proposto como complexo *A. baumannii* – *calcoaceticus* (PELEG et al., 2008). A espécie considerada clinicamente mais importante é *A. baumannii* devido a sua patogenicidade, amplo perfil epidemiológico e resistência elevada aos antimicrobianos quando comparada às outras espécies. (HIDRI, 2012).

A identificação laboratorial de *Acinetobacter* em nível de espécie é complexa devido a grande similaridade entre as espécies do gênero, sendo necessário técnicas de tipagem molecular para sua diferenciação. O método de hibridização de DNA mantém-se como padrão ouro para a identificação genotípica (HIDRI, 2012). A presença do gene *bla*<sub>OXA-51-like</sub> é o marcador genético utilizado para identificar a espécie *A. baumannii*, pois é intrínseco desta (TURTON et al., 2006).

#### 3.2.1 Epidemiologia das infecções causadas por *A. baumannii*

O gênero *Acinetobacter* spp. está amplamente distribuído na natureza e no ambiente hospitalar, desenvolvendo-se facilmente em superfícies úmidas e secas por períodos prolongados, pois apresenta necessidades nutricionais mínimas e tolerância a condições físicas (umidade e temperatura) variadas (HOUANG et al., 2001). Coloniza a pele e outros sítios corpóreos, como períneo, trato respiratório, mucosa nasal, axilas, trato gastrointestinal e pode também estar presente em alimentos frescos (KARAGEORGOPOULOS et al., 2008; KARLOWSKY et al., 2003).

*Acinetobacter baumannii* tem emergido na última década como um dos principais patógenos nosocomiais em todo o mundo, devido sua notável capacidade de desenvolver resistência aos antimicrobianos de amplo espectro. Sua rápida disseminação e propagação clonal entre setores do hospital e, até mesmo, entre hospitais têm sido documentadas em estudos conduzidos em vários países (EL-AGEERY et al., 2012; MENDES et al., 2009b; PELEG et al., 2008).

Este microrganismo apresenta resistência a maioria dos antimicrobianos comumente utilizados na clínica médica. Atualmente, a emergência de *A. baumannii* MDR (“*multi-drug resistant*”), incluindo resistência a polimixina B, tem sido evidenciada em vários hospitais na Europa, América do Norte, Brasil, Argentina, China, Taiwan, Hong Kong, Japão e Coréias do Sul (AL JOHANI et al., 2010). Está citado entre os seis microrganismos mais isolados e de difícil tratamento devido seu alto nível de resistência segundo a “*Infectious Diseases Society of America*” (IDSA) (BOUCHER et al., 2009).

Infecções causadas por *A. baumannii* MDR são responsáveis por surtos hospitalares na Europa desde 1980, principalmente na Inglaterra, França, Alemanha, Itália, Espanha e Holanda. Nos Estados Unidos da América (EUA), nos anos de 1991 e 1992, em um hospital na cidade de Nova Iorque, foram relatados os primeiros surtos deste microrganismo, sendo sensíveis apenas a polimixa B e ampicilina/sulbactam (BOGAERTS et al., 2006; PELEG et al., 2008).

Após esta data, outros surtos têm sido observados em outras regiões deste país. Técnicas de tipagem molecular têm sido empregadas na investigação epidemiológica dos surtos com o intuito de verificar a transmissão clonal entre hospitais por meio da transferência de pacientes colonizados, confirmando-se a disseminação de isolados de *A. baumannii* MDR entre países do norte da Europa, como Bélgica e Alemanha (BOGAERTS et al., 2006; PELEG et al., 2008).

A partir dos estudos realizados na Europa, constatou-se que as taxas de resistência mais elevadas aos antibióticos carbapenêmicos encontram-se na Turquia, Grécia, Itália, Espanha e Inglaterra, e mais reduzidas na Alemanha e em países escandinavos, onde os relatos de *A. baumannii* MDR são esporádicos e geralmente notificados a partir de pacientes procedentes de outros centros hospitalares (PELEG et al., 2008).

Em estudo realizado pelo programa MYSTIC (“The Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection”) no período de 2002 a 2004, abrangendo 48 hospitais na Europa, mostrou-se que 73,1% dos isolados de *A. baumannii* eram suscetíveis a meropenem e 69,8% ao imipenem. A suscetibilidade mostrou-se reduzida a outros antimicrobianos, com 32,4%; 34,0% e 47,6% suscetíveis a ceftazidima, ciprofloxacina e gentamicina, respectivamente (UNAL et al., 2005).

Estudo realizado pelo programa de vigilância SENTRY (*Antimicrobial Surveillance Program*), envolvendo Argentina, Brasil, Chile e Colômbia, entre os anos de 1997 e 2001, verificou que as taxas de isolados *A. baumannii* MDR eram mais elevadas na Argentina, apesar de todos os países apresentarem estes microrganismos (TOGNIM et al., 2004). Outra investigação realizada pelo mesmo programa, envolvendo toda a América Latina no período de 2002 a 2004, relatou apenas 71% isolados sensíveis a imipenem ou meropenem. A diminuição da sensibilidade de *A.baumannii* aos antibióticos meropenem, imipenem, ceftazidima, piperacilina/tazobactam, ciprofloxacina e gentamicina é relatada com frequência na América Latina (TOGNIM et al., 2004).

No Brasil, o gênero *Acinetobacter* destaca-se como importante patógeno nosocomial, causando pneumonias associadas à ventilação mecânica, sepse, infecções urinárias e outras infecções relacionadas a surtos hospitalares nos CTIs desde 1996 (LEVIN et al., 1996). Estudos indicam a elevada prevalência do gene *bla<sub>OXA-23-like</sub>* em *Acinetobacter* MDR responsáveis por surtos hospitalares (CARVALHO et al., 2009; SADER et al., 2005). Em estudo realizado em oito hospitais do Rio de Janeiro, no período de janeiro de 2006 a setembro de 2007, 110 *A. baumannii* resistentes a imipenem foram isolados, sendo que 87,3% eram produtores da carbapenemase OXA 23 (CARVALHO et al., 2009).

### 3.2.2 Fatores de risco à infecção

*Acinetobacter baumannii* tem sido isolado frequentemente nos CTIs. A espécie está relacionada principalmente às infecções do trato respiratório, bacteremias após procedimentos cirúrgicos, meningites secundárias e infecções do trato urinário, podendo associar-se a situações endêmicas ou desenvolver-se após um surto epidêmico, por meio da contaminação cruzada veiculada pelas mãos dos profissionais (VALENCIA et al., 2009).

A administração de antimicrobianos de amplo espectro, principalmente imipenem e meropenem, constitui fator de risco a infecções por *A. baumannii* MDR nos CTIs, pois estes pacientes geralmente encontram-se imunodeprimidos e são submetidos à utilização frequente de dispositivos invasivos (cateter central e tubos endotraqueais), o que eleva o risco de desenvolvimento de infecções (CASTELO et al., 2013; HERNÁNDEZ – TORRES et al., 2010; LEMOS et al., 2011).

Conforme Kim et al. (2012), a literatura sugere que os fatores associados à mortalidade em pacientes com infecções por *A. baumannii* são a ocorrência de choque séptico, idade avançada e a gravidade da doença de base, sendo que o atraso no tratamento empírico pode ser um efeito agravante, elevando a possibilidade de infecções graves por *A. baumannii* MDR.

Segundo dados de um estudo realizado em hospital na Arábia Saudita, pacientes com distúrbios neurológicos estão mais susceptíveis ao desenvolvimento de feridas crônicas e IRAS por *A. baumannii* MDR. No mesmo hospital foi observado que pacientes internados no CTI apresentando doença pulmonar obstrutiva crônica e diabetes desenvolveram infecções por *A. baumannii* MDR mais frequentemente, devido à colonização oral, uso de ventilação e exposição à antibioticoterapia profilática (EL-AGEERY et al., 2012).

### 3.2.3 Identificação laboratorial

#### 3.2.3.1 Identificação fenotípica

A identificação fenotípica do gênero *Acinetobacter* compreende provas bioquímicas, como utilização da glicose pela via oxidativa, redução de nitrato a nitrito, detecção de hemólise em ágar sangue de carneiro e crescimento em caldo de infusão de cérebro e coração a 44°C, catalase positiva e oxidase negativa (PELEG et al., 2008; VEGAS et al., 2005). Entretanto, não é recomendável a identificação das espécies de *Acinetobacter* com base nas provas fenotípicas individuais, devido à complexidade deste gênero e à similaridade entre as espécies. Existem sistemas de identificação disponíveis comercialmente como Galeria Api 20E (Biomérieux), e sistemas automatizados como Vitek (Biomérieux), Phoenix (BD) e Walkway (Siemens), porém não fornecem a distinção das espécies que compõem o complexo *A. baumannii* – *calcoaceticus*, sendo necessária utilização complementar de técnicas moleculares (DIJKSHOORN et al., 2007; HIDRI, 2012).

### 3.2.3.2 Identificação genotípica

Estudos filogenéticos e de evolução dos microrganismos baseiam-se na análise dos genomas ou de partes representativas destes, com emprego de técnicas moleculares que proporcionam a identificação de sequências nucleotídicas específicas. A tipagem molecular bacteriana permite a diferenciação em nível de espécie (ou, até mesmo, em níveis taxonômicos inferiores), possibilitando o comparativo da homologia entre diferentes isolados clínicos, o que pode auxiliar na caracterização de um surto hospitalar, assim como orientar medidas de controle de infecção nos serviços de saúde. Ou seja, a identificação genotípica pode estabelecer se os microrganismos são geneticamente e epidemiologicamente correlacionados (SINGH et al., 2006). Conforme FU et al. (2010), a caracterização molecular revela que a disseminação clonal desempenha um papel importante em surtos hospitalares causados por *A. baumannii* MDR.

Primeiramente proposta por Bouvet & Grimont, a identificação molecular de representantes do gênero *Acinetobacter* em nível de espécie baseia-se na técnica de hibridização DNA-DNA, na qual o perfil de informações é gerado a partir do DNA genômico completo. Apesar desta técnica ser considerada o padrão de referência, trata-se de um processo trabalhoso para implantação na rotina laboratorial e não

permite a identificação das mais recentes genoespécies descritas (BOUVET e GRIMONT, 1986; PELEG et al., 2008).

Os métodos moleculares diferem quanto à capacidade discriminatória em diferentes níveis taxonômicos e também podem ser classificados e selecionados para uso conforme sua reprodutibilidade e custos envolvidos. Os métodos que têm sido desenvolvidos e validados para a identificação de *Acinetobacter* geralmente baseiam-se na Reação em Cadeia da Polimerase (“*Polymerase Chain Reaction*”; PCR), na qual são utilizados diferentes iniciadores específicos para regiões genômicas de interesse, Eletroforese em Campo Pulsado (“*Pulsed-field Gel Electrophoresis*”; PFGE) e na análise de Polimorfismos de Comprimento de Fragmentos de Restrição (“*Restriction Fragment Length Polymorphisms*”; RFLP) (DIANCOURT et al., 2010).

A PCR é uma técnica molecular amplamente utilizada na atualidade para a definição de espécies microbianas e apresenta vantagens relacionadas à facilidade de execução e menor custo e rapidez na geração dos resultados, porém apresenta menor reprodutibilidade quando comparada a PFGE. Tem como princípio a utilização de iniciadores, também conhecidos como “primers”, capazes de amplificar regiões definidas no DNA microbiano. Três dos principais métodos de genotipagem baseados nesta técnica são AP-PCR (“*Arbitrarily Primed-PCR*”), ERIC-PCR (“*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR*”) e REP-PCR (“*Repetitive Extragenic Palindromic Sequence-PCR*”), os quais são selecionados de acordo a região a ser amplificada (GRUNDMANN et al., 1997; SINGH et al., 2006; VERSALOVIC et al., 1994).

A PFGE é uma técnica onde há separação de fragmentos de DNA durante a eletroforese em gel pela ação de campos elétricos alternados, sendo amplamente utilizada para a identificação de linhagens bacterianas, fúngicas e de protozoários visando utilização em estudos de epidemiologia molecular (MAGALHAES et al., 2005). Baseia-se na clivagem do DNA genômico por enzimas denominadas endonucleases, que fornecem fragmentos idênticos para todos os isolados do mesmo clone. Após a digestão enzimática, os fragmentos são separados em gel de agarose imerso em um tampão de elevada força iônica, a temperaturas entre 12 e 15°C (SINGH et al., 2006).

A técnica RFLP é considerada de grande interesse taxonômico e baseia-se na digestão do DNA por endonuclease(s) e posterior separação dos fragmentos via

eletroforese unidirecional em gel de agarose ou poliacrilamida, identificando-se segmentos que passam a funcionar como marcadores moleculares em nível de espécie. Este método de tipagem molecular apresenta elevada reprodutibilidade e dispensa análises prévias da sequência de DNA a investigar. Porém, como desvantagem, apresenta um poder discriminatório menor que a PFGE, além de ser uma técnica mais trabalhosa que outros métodos, como aqueles baseados exclusivamente na PCR (DARINI et al., 1998; PELEG et al., 2008).

#### 3.2.4 Antimicrobianos utilizados no tratamento das infecções causadas por *A. baumannii*

Até o início dos anos 70, as infecções causadas por *A. baumannii* eram tratadas com sucesso por gentamicina, minociclina, ácido nalidíxico, ampicilinas ou carbenicilina. Desde então, houve aumento constante da resistência aos antimicrobianos comumente utilizados, incluindo as penicilinas, aminoglicosídeos, cefalosporinas de amplo espectro e fluoroquinolonas (BERGOGNE-BÉRÉZIN et al., 1996).

A partir de 1975, os carbapenêmicos tornaram-se opções terapêuticas de primeira escolha em vários centros hospitalares. Esta classe de antimicrobianos têm como mecanismo de ação a capacidade de ligação às PBPs presentes na parede bacteriana, provocando a lise osmótica, pois penetram com facilidade pelos canais porínicos nos microrganismos gram negativos e induzem um efeito pós-antibiótico. Comparados a outros antibióticos beta – lactâmicos, os carbapenêmicos são mais resistentes à hidrólise pela maioria das enzimas beta-lactamases, tanto cromossômicas como plasmídias, tornando-os opções terapêuticas de escolha frente a outras classes de antimicrobinos (LIVERMORE et al., 2000)

Os carbapenêmicos são opções terapêuticas importantes no tratamento das infecções hospitalares graves, como pneumonia, infecção intra-abdominal, infecções do trato urinário, infecções da pele e partes moles e podem ser utilizado em pacientes portadores de doenças crônicas e imunocomprometidos. Não estão indicados no tratamento de infecções comunitárias, como a pneumonia adquirida em comunidade (RODLOFF et al., 2006)

Contudo, desde o início da década de 1990, tem sido descrito aumento de resistência a esta classe de antimicrobianos em patógenos clinicamente importantes, como *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. e membros da família *Enterobacteriaceae* (EL-AGEERY et al., 2012). Polimixina e tigeciclina tornaram-se os antibióticos utilizados como último recurso no tratamento de *A. baumannii* MDR (GORDON et al., 2010). Embora a tigeciclina seja indicada para uso contra infecções intra-abdominais, infecções de pele complicadas e pneumonias adquiridas na comunidade causadas por *A. baumannii*, um estudo realizado em Israel apontou os primeiros casos em que se confirmou o desenvolvimento de resistência contra este antimicrobiano (NAVON-VENEZIA et al., 2007).

Como resultado, os clínicos têm recorrido as polimixinas (colistina e polimixina B), antimicrobianos que foram muito utilizados no final dos anos 50 e durante muitos anos foram consideradas as drogas de eleição para o tratamento de infecções por bacilos Gram negativos, até serem substituídas pelos aminoglicosídeos, pois estes apresentam menor toxicidade (KARAGEORGOPOULOS et al., 2008). São compostas por cadeias de polipeptídeos cíclicos que compreendem três classes diferentes comumente utilizadas na clínica médica (A, B, e E). As polimixinas A e B são administradas amplamente em todo o mundo para fins de tratamento tópico e oftalmológico. A polimixina E (colistina) sob a forma de metanosulfato de sódio é a mais utilizada nos países da América do Norte, América do Sul, Ásia, Europa e Austrália, enquanto a polimixina B sob forma parenteral é a mais comumente utilizada nos EUA, Singapura e Brasil (BERGEN et al., 2012).

Quanto ao mecanismo de ação, as polimixinas são antimicrobianos que atuam primariamente nas membranas externa e citoplasmática, agindo como detergentes catiônicos simples, sendo antagonizados por cátions bivalentes como cálcio e magnésio, que agem como estabilizadores da membrana, provocando ruptura da mesma e ocasionando a morte celular (VINCENT et al., 2005; MENDES et al., 2009a).

Pode-se citar como limitações do seu uso a toxicidade relacionada principalmente aos efeitos renais e neurológicos. A nefrotoxicidade envolve necrose tubular aguda e insuficiência renal crônica (ZAVASCKI et al., 2007). A neurotoxicidade está associada à fraqueza, parestesias periféricas e faciais, distúrbios visuais, ataxia, e até mesmo bloqueio muscular desencadeando insuficiência respiratória. Adicionalmente, alguns estudos demonstram que, a



maioria dos pacientes apresentam dois ou mais efeitos colaterais simultaneamente (MENDES et al., 2009a).

### 3.3 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

#### 3.3.1 Resistência aos beta-lactâmicos

As beta-lactamases são enzimas que rompem o anel beta-lactâmico inativando o antibiótico portador desta cadeia. A classificação destas enzimas pode se dar de acordo com sua estrutura molecular (classificação de Ambler) ou em base das diferenças em seus mecanismos catalíticos (classificação de Bush, Jacob e Medeiros) (AMBLER, 1980; BUSH et al., 1995).

O mecanismo mais prevalente de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos em *A. baumannii* é a degradação enzimática por beta-lactamases. No entanto, dada à natureza complexa deste organismo, mecanismos múltiplos muitas vezes atuam em conjunto para produzir o mesmo fenótipo de multirresistência (ROSSI e ANDREAZZI, 2006). As beta-lactamases já descritas mais presentes em isolados de *A. baumannii* são AmpC, beta-lactamase de espectro estendido (ESBL), oxacilinasas (OXA) e metalo beta-lactamases (MβL) (GORDON et al., 2010), sendo a produção das enzimas oxacilinasas o mecanismo de resistência mais prevalente (MENDES et al., 2006).

##### 3.3.1.1 Resistência aos carbapenêmicos

Os mecanismos de resistência a esta classe de antimicrobianos incluem hidrólise por beta-lactamases, alteração na permeabilidade da membrana externa, afinidade dos antibióticos pelas proteínas ligadoras de penicilina (PBPs) e aumento da atividade de bombas de efluxo (GOOTZ et al., 2008).

*Acinetobacter* spp. resistente aos antibióticos carbapenêmicos tem sido isolado no Brasil desde 2004 (HIGGINS et al., 2009). No Brasil, o principal

mecanismo de resistência aos carbapenêmicos encontrado é a presença do gene *bla*<sub>OXA-23-like</sub> (DALLA COSTA et al., 2003; MOSTACHIO et al., 2012).

#### 3.3.1.1.1 Oxacilinases

As carbapenemases do tipo OXA são enzimas classificadas no grupo D de Ambler e correspondem ao principal mecanismo responsável por resistência aos carbapenêmicos no mundo. Já foram identificadas mais de 150 diferentes variantes das enzimas oxacilinases e 45 destas apresentam atividade de hidrólise de antibióticos carbapenêmicos (KUSRADZE et al., 2011).

Em *Acinetobacter* spp., as oxacilinases são divididas geneticamente em cinco subgrupos mais comumente identificados a saber *bla*<sub>OXA-23-like</sub> (OXA-23, OXA-27, OXA-49), *bla*<sub>OXA-24-like</sub> (OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-40), *bla*<sub>OXA-58-like</sub>, *bla*<sub>OXA-143</sub> e *bla*<sub>OXA-51-like</sub> sendo esta última intrínseca à espécie *A. baumannii* (OPAZO et al., 2012). São enzimas capazes de hidrolisar carbapenêmicos, porém não são ativas contra os beta-lactâmicos da família das cefalosporinas de amplo espectro.

A primeira oxacilinase descrita conferindo resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii* foi a OXA-23, em 1985 na Escócia, posteriormente sendo relatada na Europa, Austrália, Taiti, Polinésia Francesa, China, Coreia, Singapura, Vietnã, EUA, Brasil, Líbia e Paquistão (PATON et al., 1993; PELEG et al., 2008). Outras variantes frequentes das enzimas OXA foram relatadas em *A. baumannii*, como OXA-24, na Espanha, Bélgica, Portugal, França, EUA; e OXA-58, na França, Espanha, Bélgica, Turquia, Romênia, Grécia, Itália, Austria, Argentina, Austrália, EUA, Kwait e Paquistão. Entre as enzimas relatadas com menor frequência estão: OXA-25, OXA-66, OXA-68, na Espanha; OXA-69 e OXA-78, na Turquia; OXA-70, em Hong Kong; OXA-40, OXA-58, OXA-75 e OXA-76, na França; OXA-26, na Bélgica; OXA-27, em Singapura; OXA-49, na China; OXA-64 e OXA-71, na África do Sul; OXA-65, na Argentina e OXA-69 e OXA-72, na Tailândia (PELEG et al., 2008; WALTHER-RASMUSSEN e HOIBY, 2006).

Em 1999 foram identificados, em dois hospitais na cidade de Curitiba, oito isolados de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos nos quais foi caracterizada a presença do gene *bla*<sub>OXA-23-like</sub>, constituindo o primeiro relato desta oxacilinase no Brasil (DALLA COSTA et al., 2003).

Recentemente foi descrita a identificação das enzimas OXA-72 e OXA-143 em *A. baumannii* no Brasil, aumentando, assim, a diversidade de oxacilinasas relatadas neste país. A enzima OXA-72 foi identificada pela primeira vez na Tailândia em 2004. Mais tarde, foi relatada em isolados clínicos na China, Coreia do Sul, Taiwan, Itália, Espanha e França (BARNAUD et al., 2010; HIGGINS et al., 2009; WERNECK et al., 2011). A enzima OXA-143 foi detectada pela primeira vez no Brasil em 2009. Neste estudo realizado por Higgins et al. (2009), esta enzima mostrou-se ativa contra penicilinas e carbapenêmicos não hidrolisando cefalosporinas de amplo espectro, propriedades também observadas em outras enzimas carbapenemases.

Na Austrália, durante período de 10 anos, realizou-se estudo abrangendo único centro hospitalar, evidenciando a presença do gene *bla*<sub>OXA-23-like</sub> como responsável pela resistência aos carbapenêmicos, o qual estava presente na maioria dos isolados de *A. baumannii*. Simultaneamente foi avaliada a relação clonal dos isolados através da técnica PFGE onde constatou-se que o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos não prediz a clonabilidade dos isolados. (RUNNEGAR et al., 2010).

Em estudo realizado nos EUA e México, com amostras coletadas no período entre 2005 a 2009, três novas oxacilinasas foram identificadas, OXA-235, OXA-236 e OXA-237. Neste estudo, realizado por HIGGINS et al. (2013), foram selecionadas 10 cepas de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos sendo que oito apresentavam a enzimas OXA-235 e dois apresentavam OXA-236 e OXA-237 separadamente. Pelo fato da OXA-235 ter sido isolada em maior número de cepas foi sugerida a criação de um novo subgrupo contendo o gene *bla*<sub>OXA-235-like</sub> (HIGGINS et al., 2013).

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 TIPO DE PESQUISA

Estudo descritivo e analítico centrado na investigação fenotípica e molecular de isolados clínicos bacterianos multirresistentes pertencentes ao complexo *A. baumannii - calcoaceticus*.

### 4.2 PERÍODO DA PESQUISA E SELEÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS

Foram considerados os isolados identificados como pertinentes ao complexo *A. baumannii – calcoaceticus* derivados de amostras clínicas de pacientes internados no Hospital Regional Hans Dieter Schmidt (HRHDS), localizado em Joinville – SC. Dentre 139 isolados CRAB confirmados entre janeiro de 2011 e dezembro de 2013, 118 foram incluídas para a investigação molecular, de forma a representar o período avaliado, os setores do hospital e os sítios anatômicos amostrados (Apêndice A). Ressalta-se que foram incluídos isolados referentes a dois períodos caracterizados como episódios de surtos de infecção pelo complexo *A. baumannii – calcoaceticus*, conforme o Serviço de Controle de Infecção Hospitalar (SCIH) do HRHDS: Junho/2011 (n=6) e Dezembro/2011 (n=5).

### 4.3 AVALIAÇÃO EVOLUTIVA DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE

A avaliação evolutiva do perfil de suscetibilidade aos carbapenêmicos, foi realizada a partir da análise dos resultados de suscetibilidade a esta classe de antimicrobianos referentes ao período compreendido entre 2010 e 2013 fornecidos pelo laboratório prestador de serviços microbiológicos do HRHDS.

### 4.4 LOCAIS DA PESQUISA

Os isolados foram obtidos durante a rotina de investigação microbiológica assistencial dos pacientes sob suspeita de IRAS. A identificação bacteriana e os testes fenotípicos foram realizados no Ghanem Laboratório Clínico, prestador das análises microbiológicas para o HRHDS. Os procedimentos relativos às análises moleculares foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE.

#### 4.5 IDENTIFICAÇÃO E MANUTENÇÃO DOS ISOLADOS

As amostras clínicas foram submetidas aos procedimentos rotineiros para a definição do microrganismo correspondente a cada isolado empregando-se o sistema semi-automatizado AutoScan-4 (Siemens, Munique, Alemanha), conforme instruções dos fabricantes.

Em seguida à identificação, os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo o meio de cultura Ágar Nutriente (Vetec Química, Rio de Janeiro, Brasil), composto por 5 g.L<sup>-1</sup> de Peptona de Carne, 3 g.L<sup>-1</sup> de Extrato de Carne e 15 g.L<sup>-1</sup> de ágar, sob incubação a 37°C, por 24 horas. Os cultivos foram inspecionados macro e microscopicamente. A seguir, os microrganismos foram armazenados em tubos criogênicos de 2 mL contendo seis miçangas de vidro e meio próprio para congelamento à -80°C, contendo 6% de glicerol, 37 g.L<sup>-1</sup> de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) e 0,6 g.L<sup>-1</sup> de ágar. Antes do congelamento para conservação a longo prazo a -80°C, os isolados foram inicialmente incubados a 37°C durante 48 horas, seguido de congelamento a -20°C por 24 horas.

#### 4.6 ANÁLISE DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS

##### 4.6.1 Métodos fenotípicos

A identificação inicial foi realizada utilizando o equipamento semi-automatizado AutoScan 4, juntamente com a realização da bacterioscopia para Gram.

A determinação do perfil de suscetibilidade aos antibióticos foi realizada por meio de testes de disco difusão e Etest®. Para avaliação da suscetibilidade aos carbapenêmicos, foram utilizados discos contendo imipenem ou meropenem contendo 10 µg de cada, segundo preconizado pelo “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI) do ano vigente. Simultaneamente, foram testadas outras classes de antimicrobianos nas seguintes quantidades indicadas pelo CLSI: amicacina (30 µg), ampicilina/sulbactam (10/10 µg), cefepime (30 µg), ceftriaxona (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), gentamicina (10 µg), piperacilina/tazobactam (100 /10 µg), sulfametoxazol/ trimetropim (1,25/23,75 µg), polimixina B (300 unidades) e tigeciclina (15 µg), todos do mesmo fabricante (Oxoid, Cambridge, Inglaterra).

O inóculo bacteriano contendo o microrganismo testado via técnica de disco difusão proveio de suspensão preparada a partir de uma placa contendo crescimento de 18 a 24 horas e comparada com turvação padrão 0,5 na escala de McFarland (Laborclin, Curitiba, Paraná). A suspensão foi inoculada em placa contendo meio de cultura ágar Mueller-Hinton (Biomérieux, Rio de Janeiro, Brasil). Aguardaram-se 5 minutos (não superior a 15 minutos) para subsequente aplicação dos discos de antimicrobianos (Oxoid®, Cambridge, Inglaterra). Em seguida, a placa foi incubada em posição invertida em estufa a 35°C, por 16 à 18h. Para leitura dos halos de inibição e interpretação, utilizaram-se os parâmetros estipulados pelo CLSI.

A determinação da CIM para imipenem, meropenem, polimixina B e tigeciclina foi realizada através do emprego de fitas Etest® disponíveis comercialmente (Biomérieux, Marcy-l'Etoile, França), conforme instruções do fabricante e padronização do CLSI. A preparação da suspensão bacteriana e a inoculação em placa de ágar Mueller-HHinton (Biomérieux) foram realizadas conforme descrito acima. Após deposição da fita respectiva, a placa foi incubada em posição invertida em estufa a 35°C, por 16 a 18h. Para a leitura da CIM, observou-se o crescimento confluyente e uniforme com zonas de inibição elíptica sobre o ágar.

#### 4.6.2 Métodos genotípicos

##### 4.6.2.1 Obtenção de DNA microbiano

Utilizou-se o método de choque térmico descrito por Vannechoutte et al. (1995) e Baratto & Megiolaro (2012) com modificações, a partir de cultivo em meio sólido (ágar MacConkey). Inicialmente, duas a três colônias de uma cultura pura, coletadas com alça de inoculação, foram ressuspensas em 100 µL de água estéril ultrapura (Milli-Q, São Paulo, Brasil), em microtubo de 1,5 mL. As suspensões foram submetidas a banho fervente por 5 min e, em seguida, a choque térmico em banho de gelo por 5 min. O procedimento de fervura e resfriamento foi repetido, seguido de centrifugação (Eppendorf 5415 R, Hamburg, Germany) a 8.000 x g por 10 min. Ao final do processamento, o sobrenadante foi coletado e o precipitado foi descartado. O sobrenadante contendo o DNA bacteriano foi qualificado e quantificado por meio de análise espectrofotométrica (leituras a 260 e 280 nm) em aparelho Spectrum 2000 UV e, em seguida, armazenado a -20°C até o uso subsequente.

#### 4.6.2.2 Avaliação da viabilidade do DNA microbiano

A fim de verificar a viabilidade do método de extração, o DNA bacteriano obtido via choque térmico foi submetido a PCR com emprego do par de iniciadores específicos para *A. baumannii* - GltA-F (5'-AATTTACAGTGGCACATTAGGTCC-3') e GltA-R (5'-GCAGAGATACCAGCAGAGATACACG-3') - que propiciam a amplificação de um segmento único de 722 pb do gene *gltA*, codificante para a citrato sintase bacteriana (Bartual et al., 2005). A termociclagem consistiu de uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por 3 min, seguida de 30 ciclos de 94°C por 1 min, 62°C por 30 seg e 72°C por 1 min. Uma extensão final foi conduzida a 72°C por 10 min (BARTUAL et al., 2005).

#### 4.6.2.3 Identificação de marcadores genéticos associados a carbapenemases

A investigação da presença dos genes *bla*<sub>OXA-23-like</sub>, *bla*<sub>OXA-24-like</sub>, *bla*<sub>OXA-51-like</sub>, *bla*<sub>OXA-58-like</sub>, e *bla*<sub>OXA-143</sub> nos isolados selecionados foi realizada via Multiplex PCR, empregando-se os iniciadores descritos anteriormente por Higgins et al. (2010) e Woodford et al. (2006) e apresentados na tabela 1. As reações foram estabelecidas em volume final de 50 µL, acrescentando-se, aproximadamente, 50 a 500 ng de

DNA extraído à mistura de reagentes contendo 1 U Platinum® *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 10 mM dNTPs (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido), 10X PCR *Buffer* (Invitrogen), 20 pmols de cada iniciador (Invitrogen) e 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen). As termociclagens foram realizadas em aparelho XP Cycler (BIOER Technology, Tóquio, Japão) e consistiram de uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 3 min, seguida de 30 ciclos envolvendo 1 min a 94°C, 30 seg a 52°C e 1 min a 72°C. A extensão final foi realizada a 72°C por 10 min (WOODFORD et al., 2006).

Tabela 1 - Iniciadores utilizados na detecção dos genes codificantes de oxacilinas.

Gene alvo	Sequência (5' a 3')	Produto (pb)	Referência
<i>bla</i> <sub>OXA-23-like</sub>	5'GATCGGATTGGAGAACCAGA 3' 5'ATTTCTGACCGCATTCCAT 3'	501	Woodford et al., 2006
<i>bla</i> <sub>OXA-24-like</sub>	5'GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA 3' 5'AGTTGAGCGAAAAGGGGATT 3'	246	Woodford et al., 2006
<i>bla</i> <sub>OXA-51-like</sub>	5'TAATGCTTTGATCGGCCTTG 3' 5'TGGATTGCACTTCATCTTGG 3'	353	Woodford et al., 2006
<i>bla</i> <sub>OXA-58-like</sub>	5'AAGTATTGGGGCTTGTGCTG 3' 5'CCCCTCTGCGCTCTACATAC 3'	599	Woodford et al., 2006
<i>bla</i> <sub>OXA-143</sub>	5'TGGCACTTTCAGCAGTTCCT 3' 5'TAATCTTGAGGGGGCCAACC 3'	149	Higgins et al., 2010

Visando confirmar a efetividade do método de detecção dos genes alvos, foram utilizadas, como controles positivos da reação, cepas padrão de *A. baumannii* produtoras de oxacilinas provenientes da coleção de culturas da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz/RJ) identificadas como 7892 (*bla*<sub>OXA-24-like</sub>), 7740 (*bla*<sub>OXA-58-like</sub>) e 7572 (*bla*<sub>OXA-23-like</sub> e *bla*<sub>OXA-143</sub>). A cepa *A. baumannii* ATCC (“*American Type Culture Collection*”) 19606, sensível aos carbapenêmicos, foi utilizada como controle negativo.

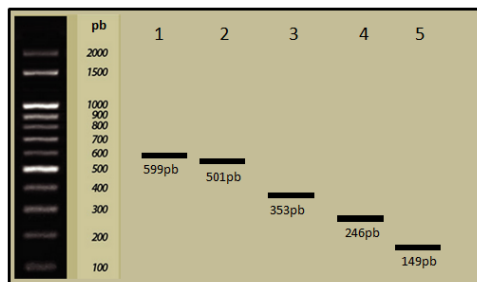
#### 4.6.2.4 Eletroforese

Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese submersa (tampão TBE) em gel de agarose a 1% contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídeo e, a seguir, a confirmação ocorreu via exposição à luz ultravioleta em transiluminador (MiniBis-Pro *Photodocumentation System* – DNR *Bio-Image Systems Ltd.*,



Jerusalém, Israel), seguido de registro digitalizado. Além do emprego de controles positivos e negativos, a confirmação da obtenção dos produtos (“amplicons”) correspondentes aos segmentos planejados deu-se através da comparação de tamanhos com um padrão disponível comercialmente (100 bp Ladder, Fermentas, Burlington, Canadá) também exposto à mesma condição de eletroforese. Deste modo, pela análise dos perfis eletroforéticos obtidos, determinou-se a presença das variantes microbianas em estudo, conforme observado na figura 1.

Figura 1 - Perfis eletroforéticos correspondentes à detecção dos genes (1) *bla*<sub>OXA-58-like</sub>, (2) *bla*<sub>OXA-23-like</sub>, (3) *bla*<sub>OXA-51-like</sub>, (4) *bla*<sub>OXA-24-like</sub> e (5) *bla*<sub>OXA-143</sub> através da técnica Multiplex PCR.



#### 4.7 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto de pesquisa foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVILLE, conforme Parecer 73.464. As cepas bacterianas foram isoladas, armazenadas e analisadas mantendo-se a identificação do paciente correspondente sob sigilo, sendo apenas identificadas por codificação definida exclusivamente para a pesquisa. Os dados relacionados ao perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos correspondentes ao período 2011 a 2013 foram autorizados e coletados junto a SCIH do HRHDS.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme as normas do Programa de Pós Graduação em Mestrado em Saúde e Meio Ambiente da UNIVILLE, este capítulo será apresentado na forma de artigo científico que será encaminhado para publicação no periódico "*Infection Control and Hospital Epidemiology*".

**Spreading of Nosocomial Infections Caused by the Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* Complex: Phenotypic and Genotypic Assessment in a Midsized Hospital in Southern Brazil**

Abstract

**OBJECTIVES:** The *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex became a major concern in health care settings due to its ability to develop resistance to several antimicrobial agents used in clinical practice, including carbapenems, which are the therapy of choice for treating severe infections. We aimed to assess the antimicrobial susceptibility profile and the prevalence of producers of distinct oxacillinases among nosocomial isolates of the *A. baumannii-calcoaceticus* complex. **SETTING:** A 249-bed general public hospital located in Joinville, southern Brazil. **METHODS:** Antimicrobial susceptibility was assessed by disk diffusion and Etest® according to the guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute. Of the 139 cases of reduced susceptibility to carbapenems between 2010 and 2013, 118 clinical isolates of varying anatomical sites and hospital sectors were selected for phenotypic and genotypic analyses. The isolates with an inhibition zone  $\leq 13$  mm using disk diffusion and a minimum inhibitory concentration (MIC)  $\geq 16$   $\mu\text{g/mL}$  using Etest® were considered resistant to imipenem and meropenem (CRAb). Five families of genes encoding oxacillinases, namely *bla*<sub>OXA-23</sub>-like, *bla*<sub>OXA-24</sub>-like, *bla*<sub>OXA-51</sub>-like, *bla*<sub>OXA-58</sub>-like, and *bla*<sub>OXA-143</sub>, were investigated by multiplex polymerase chain reaction (PCR). **RESULTS:** Most isolates (87,3%) simultaneously carried the *bla*<sub>OXA-23</sub>-like and *bla*<sub>OXA-51</sub>-like genes, whereas three isolates (2,5%) harbored only the *bla*<sub>OXA-51</sub>-like gene. In addition, the circulation of CRAb isolates increased during the study period: 2010 (none), 2011 (n = 22), 2012 (n = 64), and 2013 (n = 53). **CONCLUSIONS:** Isolates carrying the *bla*<sub>OXA-23</sub>-like and *bla*<sub>OXA-51</sub>-like genes were widely distributed and might have contributed to the increasing incidence of CRAb strains in the hospital investigated.

The *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex emerged in the last decade as a major nosocomial pathogen complex worldwide because of its remarkable ability to develop resistance to broad-spectrum antimicrobial agents.<sup>1,2</sup> These bacterial strains can persist for long periods of time on both wet and dry surfaces, as they exhibit minimal nutritional requirements, are tolerant to various physical conditions such as humidity and temperature, and can cause frequent hospital-acquired infection outbreaks.<sup>3</sup> In addition, this complex is highly predominant in intensive care units (ICU) and has been involved mainly in respiratory tract infections that are associated with mechanical ventilation, postoperative bacteremia, secondary meningitis, and urinary tract infections.<sup>1,2,4</sup>

*A. baumannii* has innate resistance to most antimicrobials commonly used in medical practice, including carbapenems, a class of  $\beta$ -lactam antibiotics.<sup>5</sup> Resistance to carbapenems involves combined mechanisms including enzymatic hydrolysis by  $\beta$ -lactamases, altered permeability of the outer cell membrane, antibiotic affinity to penicillin-binding proteins, and increased activity of efflux pumps.<sup>3</sup> The OXA-type carbapenemases (oxacillinases) belong to Ambler class D  $\beta$ -lactamases and constitute the main resistance mechanism to carbapenems worldwide. In the genus *Acinetobacter*, oxacillinases are genetically divided into five commonly identified subgroups: *bla*<sub>OXA-23</sub>-like (OXA-23, OXA-27, and OXA-49), *bla*<sub>OXA-24</sub>-like (OXA-24, OXA-25, OXA-26, and OXA-40), *bla*<sub>OXA-58</sub>-like, *bla*<sub>OXA-143</sub>, and *bla*<sub>OXA-51</sub>-like, the latter being intrinsic to *A. baumannii*.<sup>6</sup>

Tracking of nosocomial infections, particularly when combined with the assessment of phenotypic and genotypic profiles of the most important multidrug-resistant pathogens, enables the implementation of containment measures during infection outbreaks and the development of adequate infection control practices.<sup>4</sup> Therefore, the present study aimed to

assess the antimicrobial susceptibility profile and the prevalence of producers of distinct oxacillinases among nosocomial isolates in the *A. baumannii-calcoaceticus* complex.

## **METHODS**

### **Clinical isolates**

The study was performed in a general public hospital located in Joinville, southern Brazil with 249 beds, 20 of which were located in the ICU. Data on the antimicrobial susceptibility profile of the *A. baumannii-calcoaceticus* complex and *Pseudomonas* spp. were obtained from the Hospital Infection Control Service for the period between 2010 and 2013. For phenotypic and genotypic assessment, 118 clinical isolates of carbapenem-resistant *A. baumannii* (CRAb) from patients hospitalized for at least 72 h were used.<sup>7</sup> These isolates were obtained from samples of bronchoalveolar lavage fluid, blood, urine, pericardial and abdominal fluids, and catheter tips between June 2011 and August 2013. Microbial identification was performed exclusively on isolated colonies using the semi-automated system Autoscan®-4 (Siemens, Munich, Germany) and was complemented by Gram staining. The study was reviewed and approved by the Research Ethics Committee of University of Region of Joinville (UNIVILLE) (protocol 73464).

### **Antimicrobial susceptibility analysis**

Antimicrobial susceptibility was assessed via disk diffusion according to the guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).<sup>9</sup> The antimicrobial agents tested were imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), polymyxin B (300 units),

tigecycline (15 µg), ampicillin/sulbactam (10 µg/10 µg), amikacin (30 µg), gentamicin (10 µg), ciprofloxacin (5 µg), ceftriaxone (30 µg), cefepime (30 µg), piperacillin/tazobactam (100 µg/10 µg), and sulfamethoxazole/trimethoprim (1.25 µg/23.75 µg), all of which were purchased from the same manufacturer (Oxoid, Cambridge, England). The minimum inhibitory concentrations (MICs) for imipenem, meropenem, polymyxin B, and tigecycline were determined using Etest® strips according to the manufacturer's instructions (Biomérieux, Marcy-l'Etoile, France).

The interpretation of the inhibition zones formed in the presence of the antimicrobials was performed as recommended by the CLSI, except for tigecycline, for which there is no standardization to date.<sup>9</sup> For this latter case, the interpretation criteria used were those adopted by the United States Food and Drug Administration (FDA) for enterobacteria when using the disk diffusion method, namely susceptible:  $\geq 19$  mm, intermediate: 15–18 mm, and resistant:  $\leq 14$  mm.<sup>8</sup>

#### **Phenotypic assessment of carbapenemase-producing isolates**

Isolates with inhibition zones of  $\leq 13$  mm using disk diffusion and a MIC  $\geq 16$  µg/mL using Etest® were considered as possible producers of carbapenemases and resistant to both imipenem and meropenem. The modified Hodge test was not used in this study because the CLSI no longer recommends it in routine laboratory screening for carbapenemase-producing strains.<sup>9</sup>

#### **Detection of genes encoding oxacillinases**

Bacterial DNA was extracted by heat shock.<sup>10</sup> Two to three medium-sized colonies of each isolate were suspended in 100 µL of sterile ultrapure water (MilliQ, São Paulo, Brazil). The suspensions were heated in a boiling water bath for 5 min, followed by cooling in an ice bath for 5 min. The boiling and cooling procedures were repeated once more, followed by centrifugation at 8,000 x g for 10 min. After spectrophotometric readings at wavelengths of 260 and 280 nm, an aliquot of the supernatant (100 µL) containing bacterial DNA was stored at -20 °C.

To determine the feasibility of the extraction method and to confirm the identification of the specie *A. baumannii* in isolates, the extracted DNA was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the specific primer pair *gltA*-F (AATTTACAGTGGCACATTAGGTCC) and *gltA*-R (GCAGAGATACCAGCAGAGATACACG), which enables the amplification of a single 722 bp segment of the citrate synthase gene (*gltA*). The PCR reaction was performed in an XP Cyclor device (BIOER Technology, Tokyo, Japan) using the following program: initial denaturation step at 94 °C for 3 min; 30 cycles at 94 °C for 1 min, 62 °C for 30 sec, and 72 °C for 1 min, and a final extension step at 72 °C for 10 min.<sup>11</sup>

Moreover, multiplex PCR was used to identify five families of oxacillinase-encoding genes in *A. baumannii*, namely *bla*<sub>OXA-23</sub>-like, *bla*<sub>OXA-24</sub>-like, *bla*<sub>OXA-51</sub>-like, *bla*<sub>OXA-58</sub>-like, and *bla*<sub>OXA-143</sub>, using the primer pair shown in Table 1.<sup>12,13</sup>

Table 1 – Primer pair used for the detection of oxacillinase-encoding genes.

Target gene	Sequence (5' to 3')	Product size (bp)	Reference
<i>bla</i> <sub>OXA-23-like</sub>	GATCGGATTGGAGAACCAGA	501	Woodford et al. (2006)
	ATTTCTGACCGCATTTCAT		
<i>bla</i> <sub>OXA-24-like</sub>	GGTTAGTTGGCCCCCTAAA	246	Woodford et al. (2006)
	AGTTGAGCGAAAAGGGGATT		
<i>bla</i> <sub>OXA-51-like</sub>	TAATGCTTTGATCGGCCTTG	353	Woodford et al. (2006)
	TGGATTGCACTTCATCTGG		
<i>bla</i> <sub>OXA-58-like</sub>	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG	599	Woodford et al. (2006)
	CCCCTCTGCGCTCTACATAC		
<i>bla</i> <sub>OXA-143</sub>	TGGCACTTTCAGCAGTTCCT	149	Higgins et al. (2010)
	TAATCTTGAGGGGGCCAACC		

bp: base pair

For this purpose, the PCR reactions were performed in a final volume of 50  $\mu$ L. Approximately 50 to 500 ng of extracted DNA was added to the reagent mixture comprising 1 U Platinum<sup>®</sup> Taq DNA Polymerase (Invitrogen, São Paulo, Brazil), 0.2 mM dNTPs (GE Healthcare, Little Chalfont, UK), 1 X PCR Buffer (Invitrogen), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), and 20 pmol of each primer (Invitrogen). The reaction was adapted from Woodford et al. (2006) and consisted of a denaturation step at 94 °C for 3 min, followed by 30 cycles at 94 °C for 1 min, 52 °C for 30 s, and 72 °C for 1 min. The final extension was performed at 72 °C for 10 min.<sup>13</sup>



The PCR products were subjected to 1% agarose gel electrophoresis, and the size was confirmed under UV exposure (MiniBis-Pro Photodocumentation System – DNR Bio-Image Systems Ltd., Jerusalem, Israel), followed by image scanning.

The following standard oxacillinase-producing *A. baumannii* strains from the culture collection of the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ/RJ) were used as positive controls: strain 7892 (*bla*<sub>OXA-24</sub>-like), strain 7740 (*bla*<sub>OXA-58</sub>-like), and strain 7572 (*bla*<sub>OXA-23</sub>-like and *bla*<sub>OXA-143</sub>).

## RESULTS

Most of the 118 clinical isolates (77,1%, n = 91) of *A. baumannii* originated from routine diagnostic assessments of patients with suspected infection were collected primarily from bronchoalveolar lavage fluid (n = 64) and blood (n = 27) and less frequently from wound secretions (n = 10), urine (n = 8), other bodily fluids (n = 5), sputum (n = 2), and catheter tips (n = 2). Most isolates (62,7%; n = 74) came from patients hospitalized in the ICU, and the remaining isolates (n = 44) came from patients housed in other hospital sectors, 39 of which were inpatient units.

### Phenotypic assessment

All 118 isolates were resistant to the antimicrobials cefepime, ceftriaxone, ciprofloxacin, imipenem, meropenem, and piperacillin/tazobactam (Figure 1). Resistance to amikacin and gentamicin was confirmed in 80,5% (n = 95) and 83,9% (n = 99) of the isolates, respectively. For ampicillin/sulbactam, 94.1% of the isolates (n = 111) exhibited complete resistance, and 5,9% (n = 7) exhibited intermediate resistance, whereas no isolates were

susceptible to these agents. A single isolate (0.8%) was susceptible to sulfamethoxazole/trimethoprim. In addition, all isolates tested were susceptible to polymyxin B, whereas 88,1% (n = 104) and 11,9% (n = 14) exhibited either complete or intermediate susceptibility to tigecycline, respectively.

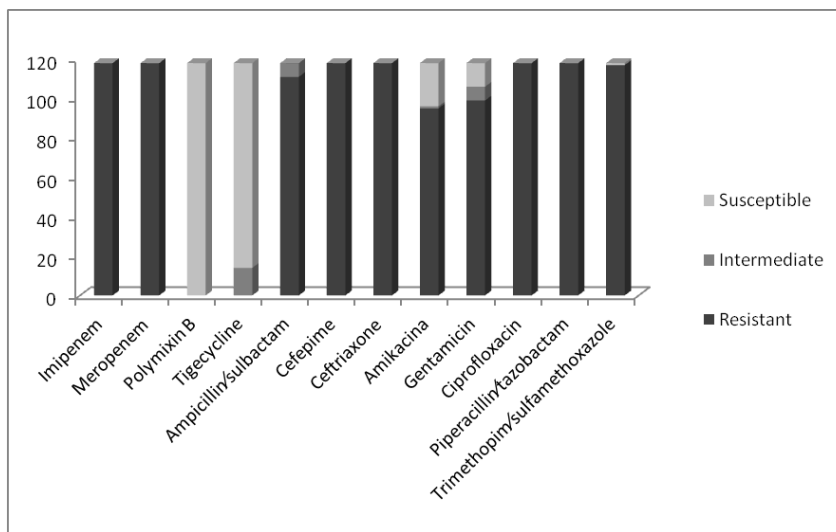


FIGURE 1 – *In vitro* antimicrobial susceptibility profile for clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*: (S) susceptible; (I) intermediate; and (R) resistant.

Using Etest® strips, all isolates exhibited MIC  $\geq$  16  $\mu$ g/mL (resistance phenotype) to imipenem and meropenem, whereas the MIC ranged from 0,2–2,0  $\mu$ g/mL and 0,5–4,0  $\mu$ g/mL for polymyxin B and tigecycline, respectively.

## Genotypic assessment

Figure 2 exemplifies a electrophoretic profile resulting from the investigation of oxacillinase-encoding genes in the clinical isolates of the present study.

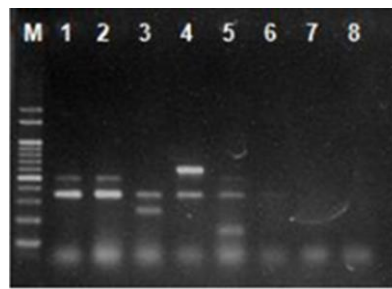


FIGURE 2 – Identification of oxacillinase-encoding genes by multiplex polymerase chain reaction (PCR): (M) Molecular weight standards (100 bp ladder, Fermentas, Ontario, Canada); (1 and 2) *bla*<sub>OXA-23</sub>-like (501 bp) and *bla*<sub>OXA-51</sub>-like (353 bp); (3) *bla*<sub>OXA-24</sub>-like (246 bp) and *bla*<sub>OXA-51</sub>-like; (4) *bla*<sub>OXA-58</sub>-like (599 bp) and *bla*<sub>OXA-51</sub>-like; (5) *bla*<sub>OXA-23</sub>-like, *bla*<sub>OXA-51</sub>-like, and *bla*<sub>OXA-143</sub> (149 bp); (6) carbapenem-susceptible clinical isolate of the *A. baumannii-calcoaceticus* complex; (7) human DNA; and (8) PCR negative control.

Most isolates (87,3%) simultaneously carried the *bla*<sub>OXA-23</sub>-like and *bla*<sub>OXA-51</sub>-like genes, whereas three isolates (2,5%) had only the *bla*<sub>OXA-51</sub>-like gene. Twelve isolates (10,2%) either did not contain any of the genes investigated (n = 6), or the results were inconclusive (n = 6). The isolates in which both the *bla*<sub>OXA-23</sub>-like and *bla*<sub>OXA-51</sub>-like genes were simultaneously detected and those harboring only the *bla*<sub>OXA-51</sub>-like gene had MIC  $\geq$  16  $\mu$ g/mL for imipenem and meropenem. The isolates that exhibited either intermediate or complete susceptibility to tigecycline did not differ in the simultaneous occurrence of the

*bla*<sub>OXA-23</sub>-like and *bla*<sub>OXA-51</sub>-like genes. Considering the 103 clinical isolates that simultaneously harbored the *bla*<sub>OXA-23</sub>-like and *bla*<sub>OXA-51</sub>-like genes, 62 (60,2%) were present in the ICU, and the remaining isolates (n = 41) were present in other hospital wards.

### **Evolution of the antimicrobial susceptibility profile**

In the hospital assessed, nine *A. baumannii* isolates were identified in 2010, from which a single isolate exhibited intermediate susceptibility to the carbapenems imipenem and meropenem. In 2011, 22 CRAb isolates were identified, representing 84,6% of the samples. In June of the same year, the first nosocomial outbreak of *A. baumannii* was reported, with the confirmation of six CRAb isolates, four of which derived from bronchoalveolar lavages of ICU patients. In December of the same year, a second outbreak was confirmed in which five CRAb isolates were identified, three of which were from bronchoalveolar lavages of ICU patients. Notably, until 2011, all isolates had remained susceptible to tigecycline. Moreover, all CRAb isolates associated with the outbreaks in 2011 (n = 11) had both the *bla*<sub>OXA-51</sub>-like and *bla*<sub>OXA-23</sub>-like genes, were susceptible to tigecycline and polymyxin B, and did not show any differences in the characteristics evaluated when compared with the other isolates.

In 2012, the number of carbapenem-resistant isolates had increased to 64 (96,9%), 40 of which came from the ICU, and 34 of which were collected from bronchoalveolar lavage fluids. In the next year, 53 resistant isolates were confirmed, 36 of which came from the ICU, and 26 of which were collected from bronchoalveolar lavage fluids. Also in 2013, eight (15,1%) and three (5,7%) isolates exhibited intermediate or complete resistance to tigecycline, respectively. Figure 3 shows the evolution of the susceptibility profile to the antimicrobials imipenem, meropenem, and tigecycline.

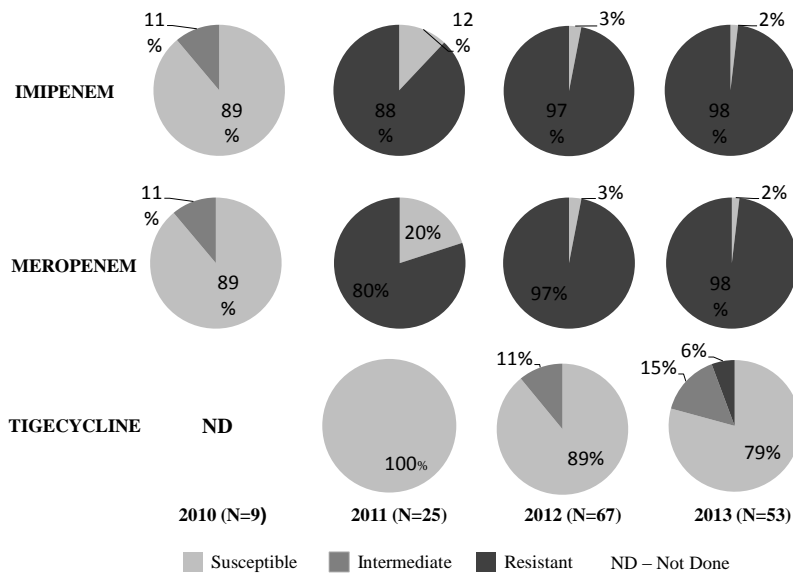


FIGURE 3 – Susceptibility profile of the *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex to the antimicrobials imipenem, meropenem, and tigecycline between 2010 and 2013.

Figure 4 shows the evolution of the incidence of CRAB isolates between 2011 and 2013 compared with another microorganism that has similar phenotypic characteristics and is also resistant to carbapenems (*Pseudomonas* spp.) at the same hospital.

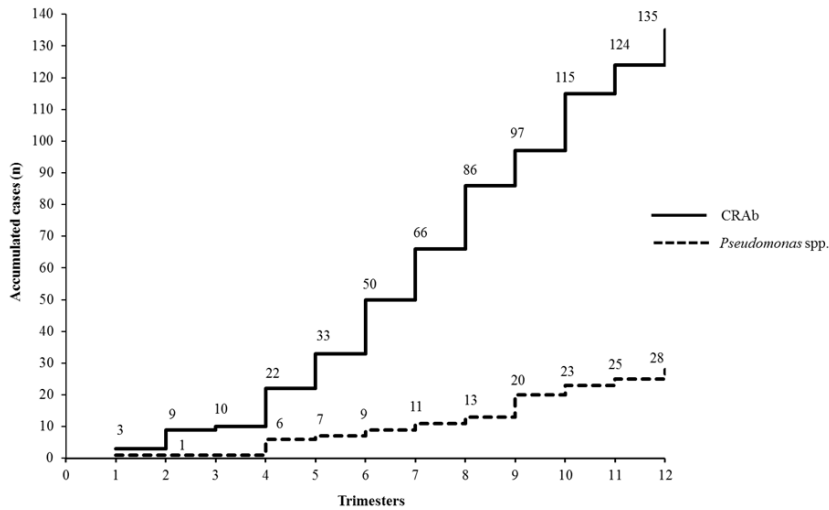


FIGURE 4 – Comparative incidence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAb) and carbapenem-resistant *Pseudomonas* spp. isolates.

## DISCUSSION

Our results revealed that the *bla*<sub>OXA-23</sub>-like and *bla*<sub>OXA-51</sub>-like genes were widely distributed in the clinical isolates analyzed, which might have contributed to the increasing incidence of CRAb strains in the hospital investigated.

The Infectious Diseases Society of America has placed *A. baumannii* among the six most frequently isolated and difficult to treat microorganisms because of its high level of resistance, which makes this species responsible for frequent nosocomial infection outbreaks.<sup>14</sup> In addition, *A. baumannii* strains are involved in major outbreaks and have been investigated by molecular typing techniques to determine their clonal dissemination between hospitals through colonized patients and health professionals.<sup>15</sup>

Infections caused by the *A. baumannii-calcoaceticus* complex have been responsible for nosocomial outbreaks in Europe since 1980, mainly in England, France, Germany, Italy, Spain, and Holland.<sup>15</sup> In Brazilian hospitals, infections have been reported since 1996, mainly at ICUs.<sup>16</sup>

Carbapenems have become primary therapeutic options in various hospitals, but the continued use of these antimicrobials has been compromised by the emergence of novel resistance mechanisms.<sup>1</sup> The production of oxacillinase enzymes, mainly through the expression of the *bla*<sub>OXA-23</sub>-like gene, is the most common resistance mechanism reported in CRAB isolates in diverse countries including Bulgaria, China, Iraq, Afghanistan, and French Polynesia.<sup>17</sup>

Previous studies conducted in Brazil revealed the increasing incidence of nosocomial outbreaks caused by multi-drug resistant (MDR) strains of the genus *Acinetobacter*.<sup>18,19</sup> In a study performed from January 2006 to September 2007 in eight hospitals in Rio de Janeiro, 110 imipenem-resistant *A. baumannii* strains were isolated, among which 87,3% were producers of OXA-23 carbapenemase.<sup>18</sup> Another Brazilian study analyzed the genotypic characteristics of 46 CRAB isolates from eight hospitals in the State of Paraná and reported that all isolates harbored the *bla*<sub>oxa-23</sub>-like gene.<sup>19</sup>

A study conducted by the Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection (MYSTIC) program for the period 2002–2004 covering 48 hospitals in Europe indicated that 73.1% of the *A. baumannii* isolates were susceptible to meropenem, and 69.8% were susceptible to imipenem.<sup>21</sup> In another study by the Antimicrobial Surveillance Program in Latin America covering Argentina, Brazil, Chile, and Colombia from 2002 to 2004, only 71% of the isolates were susceptible to imipenem or meropenem. That study showed that the resistance rates were higher in Argentina. Nevertheless, all the countries evaluated had *A. baumannii* isolates resistant to the carbapenems imipenem and meropenem.<sup>22</sup>

In 2005, an outbreak caused by MDR *A. baumannii* was detected in the states of Illinois and Indiana in the United States. During the study performed in five hospitals in a 16 month period on 86 patients with bloodstream infections, the resistance gene encoding for the OXA-40 carbapenemase was identified for the first time in the United States. This gene can confer resistance to all  $\beta$ -lactam antibiotics. The isolates identified were susceptible to colistin and in some cases to tigecycline. The mortality rate was 41%, and one third of the patients who died had a positive blood culture for *A. baumannii*.<sup>23</sup>

Other studies have revealed that *A. baumannii* strains typically spread through clonal dissemination. A study conducted in Australia in a single hospital during a 10 year period showed that the *bla*<sub>OXA-23</sub>-like gene, present in most isolates, was responsible for carbapenem resistance. In addition, the clonal relationship among the isolates was evaluated through pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), demonstrating that the antimicrobial susceptibility profile does not predict isolate clonality.<sup>24</sup>

In Brazil, the major mechanism of carbapenem resistance is through the expression of the *bla*<sub>OXA-23</sub>-like gene.<sup>25</sup> In addition, this gene is frequently detected in isolates from Asia and Europe,<sup>26</sup> and in most cases, it is found concomitantly with the *bla*<sub>OXA-51</sub>-like gene.<sup>2,12</sup> Notably, the *bla*<sub>OXA-23</sub>-like and *bla*<sub>OXA-51</sub>-like genes may be overexpressed when associated with the insertion sequence ISAbal because this sequence constitutes a promoter region for both genes.<sup>27</sup> In the present study, the resistance of the CRAb isolates (N = 6) that did not contain any of the *bla*<sub>OXA</sub> genes investigated may be associated with other less frequent resistance mechanisms, such as altered outer membrane permeability and the increased activity of efflux pumps.<sup>5</sup>

Many institutions have observed an increased incidence of healthcare-associated infections (HAI) by *A. baumannii*. This pathogen has become resistant to all  $\beta$ -lactam



antibiotics (including carbapenems), all fluoroquinolones, sulfamethoxazole/trimethoprim, and most, if not all, aminoglycosides.<sup>28</sup> Therefore, treatment options are limited.

Tigecycline, colistin, and polymyxin B can be used as last-resort drugs for the treatment of infections caused by CRAB isolates in hospital settings. However, these antimicrobials have their own limitations and may not be indicated for several clinical conditions. For example, polymyxin B has nephrotoxic and neurotoxic effects.<sup>2</sup> In addition, decreased susceptibility to these antimicrobials became a major concern. A study performed in Spain revealed that the susceptibility to tigecycline decreased during the course of treatment, with an increase in the MIC to  $\geq 2 \mu\text{g/mL}$ .<sup>29</sup> In our study, all the isolates were susceptible to polymyxin B during the period investigated; however, 10.4% and 15.1% of the isolates had intermediate resistance to tigecycline in 2012 and 2013, respectively. Even worse, three (5.7%) isolates were considered resistant to tigecycline in the last year of data collection.

The overuse of antimicrobials and the neglect of standard routines for hand hygiene have led to the emergence and spread of MDR pathogens in hospital settings, and the adoption of effective measures to prevent nosocomial outbreaks is warranted.<sup>4,30</sup> The antimicrobial susceptibility profile evaluated in this study indicated a gradual increase in circulating CRAB strains during the period considered. In addition, the predominance of the genotypic profile *bla*<sub>OXA-23</sub>-like/*bla*<sub>OXA-51</sub>-like among the clinical isolates investigated enabled us to hypothesize the occurrence of cross infection. Taken together, our results suggest an extensive dissemination of CRAB isolates in hospital environments and warrant the need for a systematic review of preventive measures and the implementation of effective outbreak control measures.

Acknowledgments:

*Financial support.* This study was supported by Research Fund from University of Region of Joinville (FAP/UNIVILLE).

*Potential conflicts of interest.* All authors report no conflicts of interest relevant to this article.

## References

1. El-Ageery SM , Abo-Shadi MA, Alghaithy AA, Ahmad MA, Alsharih NH, Alharbi SA. Epidemiological investigation of nosocomial infection with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2012;16:1834-1839.
2. Mendes RE, Bell JM, Turnidge JD, Castanheira M, Jones RN. 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* 2009;63:55-59.
3. Sydnor ER, Perl TM. Hospital epidemiology and infection control in acute-care settings. *Clin Microbiol Rev* 2011;24:141-173.
4. Chang HC, Chen YC, Lin MC, et al. Mortality risk factors in patients with *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia. *J Formos Med Assoc* 2011;110:564-571.
5. Al-Johani SM, Akhter J, Balkhy H, El Saed A, Younan M, Memish Z. Prevalence of antimicrobial resistance among gram-negative isolates in an adult intensive care unit at a tertiary care center in Saudi Arabia. *Ann Saudi Med* 2010;30:364-369.
6. Opazo A, Domínguez M, Bello H, Amyes SG, González-Rocha G. OXA-type carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* in South America. *J Infect Dev Ctries* 2012;6:311-316.
7. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections, 1988. *Am J Infect Control* 1988;16:128-140.
8. Tigecycline (Tygacil). *Med Lett Drugs Ther* 2005;47:73-74.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 20th informational supplement. website. <http://www.clsi.org/>. Published 2010. Accessed November 4, 2013.

10. Vaneechoutte M, Dijkshoorn L, Tjernberg I, et al. Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *J Clin Microbiol* 1995;33:11-15.
11. Bartual SG, Seifert H, Hippler C, Luzon MA, Wisplinghoff H, Rodríguez-Valera F . Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 2005;43:4382-4390.
12. Higgins PG, Lehmann M, Seifert H. Inclusion of OXA-143 primers in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 35: p. 305.
13. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents* 2006;27:351-353.
14. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, et al. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2009;48:1-12.
15. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2008;21:538-582.
16. Levin AS, Mendes CM, Sinto SI, et al. An outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* in a university hospital in São Paulo, Brazil. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1996;17:366-368.
17. Mugnier PD, Poirel L, Naas T, Nordmann P. Worldwide dissemination of the *bla*<sub>OXA-23</sub> carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis* 2010;16:35-40.
18. Carvalho KR, Carvalho-Assef APD, Peirano G, Santos LCG, Pereira MJF, Asensi, MD. Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying *bla*<sub>OXA-23</sub> collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *Int J Antimicrob Agents* 2009;34:25-28.

19. Cieslinski JM, Arend L, Tuon FF, et al. Molecular epidemiology characterization of OXA-23 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* isolated from 8 Brazilian hospitals using repetitive sequence-based PCR. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013;77:337-340.
20. Sader HS, Castanheira M, Mendes RE, Toleman M, Walsh TR, Jones RN. Dissemination and diversity of metallo- $\beta$ -lactamases in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Int J Antimicrob Agents* 2005;25:57-61.
21. Unal S, Garcia-Rodriguez JA. Activity of meropenem and comparators against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. isolated in the MYSTIC Program, 2002-2004. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005;53:265-271.
22. Tognim MC, Andrade SS, Silbert S, Gales AC, Jones RN, Sader HS. 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* 2004;8:284-291.
23. Munoz-Price LS, Zembower T, Penugonda S, et al. Clinical outcomes of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* bloodstream infections: study of a 2-state monoclonal outbreak. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2010;31:1057-1062.
24. Runnegar N, Sidjabat H, Goh HM, Nimmo GR, Schembri MA, Paterson DL. Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a single institution over a 10-year period. *J Clin Microbiol* 2010;48:4051-4056.
25. Mostachio AK, Levin AS, Rizek C, Rossi F, Zerbini J, Costa SF. High prevalence of OXA-143 and alteration of outer membrane proteins in carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. isolates in Brazil. *Int J Antimicrob Agents* 2012;39:396-401.
26. Fu Y, Zhou J, Zhou H, et al. Wide dissemination of OXA-23 producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal complex 22 in multiple cities of China. *J Antimicrob Chemother* 2010;65:644-650.

27. Ruiz M, Marti S, Fernandez-Cuenca F, Pascual A, Vila J. High prevalence of carbapenem-hydrolysing oxacilinases in epidemiologically related and unrelated *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Spain. *Clin Microbiol Infect* 2007;13:1192-1198.
28. Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:3471-3484.
29. Hernández- Torres A, García-Vázquez E, Gómez J, et al. Carbapenem and multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* colonisation/infection: epidemiology and factors associated with infection. *Med Clin (Barc)* 2010;135:389-396.
30. Castelo Branco Fortaleza CM, Moreira de Freitas F, da Paz Lauterbach G. Colonization pressure and risk factors for acquisition of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a medical surgical intensive care unit in Brazil. *Am J Infect Control* 2013;41:263-265.

### **Confirmação da Submissão do Artigo à Revista**

Dear Dr. Dall Cortivo,

Your submission entitled "Spreading of Nosocomial Infections Caused by the Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* Complex: Phenotypic and Genotypic Assessment in a Midsized Hospital in Southern Brazil" has been received by Infection Control and Hospital Epidemiology

You will be able to check on the progress of your manuscript by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is <http://iche.edmgr.com/>.

Your manuscript will be assigned a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to ICHE.

Thanks,

Rob Blixt

Managing Editor

Infection Control and Hospital Epidemiology The University of Chicago Press

[iche@press.uchicago.edu](mailto:iche@press.uchicago.edu)

## 6 CONCLUSÃO

No presente estudo foram avaliados a suscetibilidade aos antimicrobianos e a presença dos genes do tipo OXA do complexo *A. baumannii* - *calcoaceticus* resistente aos antibióticos carbapenêmicos (imipenem e meropenem) no centro hospitalar HRHDS no período 2010 a 2013:

- A avaliação da evolução temporal do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos imipenem e meropenem evidenciou o rápido crescimento do número de isolados resistentes a partir de 2011.
- Os genes *bla*<sub>OXA-23-like</sub> e *bla*<sub>OXA-51-like</sub>, codificantes para oxacilinases, predominaram na maioria dos isolados clínicos avaliados. Os demais subgrupos genéticos pesquisados - *bla*<sub>OXA-58-like</sub>, *bla*<sub>OXA-24-like</sub> e *bla*<sub>OXA-143</sub> não foram detectados.
- O conhecimento da existência e permanência, desde 2011, de isolados portadores dos genes *bla*<sub>OXA</sub> associados a IRAS no ambiente hospitalar indica a necessidade de revisão de medidas de controle da transmissão e disseminação de surtos de modo a torná-las mais eficazes.
- Por fim, os resultados obtidos apontam a realização de estudos moleculares e epidemiológicos para a investigação e acompanhamento da ocorrência e disseminação de novos clones de *A. baumannii* multirresistentes em diferentes localidades do território brasileiro.



## 7 REFERÊNCIAS

AL JOHANI, S.M. et al. Prevalence of antimicrobial resistance among gram-negative isolates in an adult intensive care unit at a tertiary care center in Saudi Arabia. **Ann Saudi Med**, v.30, n.5, p.364-369, 2010.

ÁLVAREZ-PÉREZ, S. et al. *Acinetobacter nectaris* sp. nov. and *Acinetobacter boissieri* sp. nov., isolated from floral nectar of wild Mediterranean insect-pollinated plants. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 63, n.Pt 4, p.1532-1539, 2013.

AMBLER, R.P. The structure of beta-lactamases. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v.289, n.1036, p.321-331, 1980.

ANANDHAM, R. et al. *Acinetobacter brisouii* sp. nov., isolated from a wetland in Korea. **J Microbiol**, v.48, n.1, p. 36-39, 2010.

BARATTO, C. M.; MEGIOLARO, F. **Comparação de diferentes protocolos de extração de dna de bactérias para utilização em RAPD-PCR**. Unoesc & Ciência – ACET, v. 3, n. 1, p. 121-130, 2012.

BARNAUD, G. et al. Two sequential outbreaks caused by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing OXA-58 or OXA-72 oxacilinase in an intensive care unit in France. **J Hosp Infect**, v.76, n.4, p.358-360, 2010.

BARTUAL, S.G. et al. Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **J Clinical Microbiol**, v. 43, n.49, p. 4382-4390, 2005.

BERGEN, P.J. et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of 'old' polymyxins: what is new? **Diag Microbiol Infect Dis**, vol. 74, n.3, p. 213-223, 2012.

BERGOGNE-BÉRÉZIN, 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.

BOGAERTS, P. et al. Outbreak of infection by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenemase OXA-58 in Belgium. **J Clin Microbiol**, v. 44, n.11, p. 4189-4192, 2006.

BOUCHER, H.W. et al. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis**,v.48, n.1, p.1-12, 2009.

BOUVET, P. J.; GRIMONT, P.A. 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 description of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. **Int J Syst Bacterio**, v.36, n.2, p.228-240, 1980.

BOUVET, P.J.; GRIMONT, P.A. 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 description of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. **Int J Syst Bacteriol**, v.36, n.2, p.228–240, 1986.

BROWN, S.; AMYES, S. OXA (beta)-lactamases in *Acinetobacter*: the story so far. **J Antimicrob Chemother**, v. 57, n.1, p.1-3, 2006.

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, n.6, p.1211-1233, 1995.

CARNEIRO, M.; SARIDAKIS, H. O. Pneumonia associada à ventilação mecânica por *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenem. **Rev Panam Infectol**, v.10, n.2, p.28-33, 2008.

CARR, E.L. et al. Seven novel species of *Acinetobacter* isolated from activated sludge. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 53, n. Pt 4, p.953-963, 2003.

CARVALHO, K.R. et al. Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying bla(OXA-23) collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **Int J Antimicrob Agents**, v.34, n.1, p. 25-28, 2009.

CASTELO BRANCO FORTALEZA, C.M.; MOREIRA DE FREITAS, F.; da PAZ LAUTERBACH, G. Colonization pressure and risk factors for acquisition of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a medical surgical intensive care unit in Brazil. **Am J Infect Control**, v.41, n.3, p.263-265, 2013.

CHANG, H.C. et al. Mortality risk factors in patients with *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia. **J Formos Med Assoc**, v.110, n.9, p.564-571, 2011.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. CLSI document M100S-23.** Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute 2013.

DALLA-COSTA, L.M. et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. **J Clin Microbiol**, v. 41, n.7, p. 3403-3406, 2003.

DARINI, A.L.C.; MAGALHÃES, V.D.; CROTT, L.S.P. Aplicações da ribotipagem na epidemiologia molecular de infecções bacterianas. **Medicina Ribeirão Preto**, v. 31, n.1, p. 73-80, 1998.

DIANCOURT, L. et al. The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. **PLoS One**, v.5, n.4, p. 10034, 2010.

DIJKSHOORN, L.; NEMEC,A.; SEIFERT, H. An Increasing threat in hospitals: multidrug – resistant *Acinetobacter baumannii*. **Nat Rev Microbiol**, v.5, n.12, p.939-951, 2007.

DOLZANI, L. et al. Identification of *Acinetobacter* isolates in the *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex by restriction analysis of the 16S-23S rRNA intergenic-spacer sequences. **J Clin Microbiol**, v. 33, n.5, p.1108-1113, 1995.

DOUGHARI, H.J. et al. The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: an overview. **Microbes Environ**, v.26, n.2, p.101-112, 2011.

EL – AGEERY, S.M. et al. Epidemiological investigation of nosocomial infection with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v.16, n.13, p.1834-1839, 2012.

FU, Y. et al. Wide dissemination of OXA-23-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal complex 22 in multiple cities of China. **J Antimicrob Chemother**, v.65, n.4, p. 644-650, 2010.

GOOTZ, T. D.; MARRA, A. *Acinetobacter baumannii*: an emerging multidrug-resistant threat. **Expert Rev Anti Infect**, v. 6, n.3, p.309-325, 2008. .

GORDON, N.C.; WAREHAM, D.W. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. **Int J Antimicrob Agents**, v.35, n.3, p.219-226, 2010.

GRUNDMANN, H.J. et al. Multicenter study using standardized protocols and reagents for evaluation of reproducibility of PCR-based fingerprinting of *Acinetobacter* spp. **J Clin Microbiol**, v.35, n.12, p.3071-3077, 1997.

HERNÁNDEZ – TORRES, A. et al. Carbapenem and multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* colonisation/infection: epidemiology and factors associated with infection. **Med Clin (Barc)**, v.135, n. 9, p.389-396, 2010.

HIDRI, N. Identification d' *Acinetobacter* spp.au laboratoire. **Reveu francophone des laboratoires**. n. 441, p.37-42, 2012.

HIGGINS, P.G. et al. OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D beta-Lactamase in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53,p. n.12, 5035–5038, 2009.

HIGGINS, P.G.; LEHMANN, M.; SEIFERT, H. Inclusion of OXA-143 primers in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. **Int J Antimicrob Agents**.v.35, n.3, p. 305, 2010.

HIGGINS, P.G. et al. OXA-235, a novel Class D  $\beta$ -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 57, n.5, p. 2121-2126, 2013.

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

KARAGEORGOPOULOS, D.E.; FALAGAS, M.E. Current control and treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. **Lancet Infect Dis**, v.8, n.12, p.751–762, 2008.

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

KIM, Y.J., et al. Risk factors for mortality in patients with carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia: impact of appropriate antimicrobial therapy. **J Korean Med Sci**, v.27, n.5, p.471-475, 2012.

KUSRADZE, I.A. et al. Molecular detection of OXA carbapenemase genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Iraq and Georgia. **Int J Antimicrob Agentes**, v. 38, n.2, p. 164–168, 2011.

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

LEMOS, E. V. et al. *Acinetobacter baumannii* - related mortality in intensive care units in Colombia. **Rev Panam Salud Publica**, v. 30, n. 4, p.287-294, 2011.

LEVIN, A.S. et al. An outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* in a university hospital in São Paulo, Brazil. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v.17, n.6, p.366-368, 1996.

LIVERMORE, D.M. Beta – lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clin Microbiol**, v.8,p.557-584, 1995.

LIVERMORE, D.M.; WOODFORD, N. Carbapenemases: a problem in waiting? **Curr Opin Microbiol**, v. 3, n.5, p.489-495, 2000.

MAGALHÃES, V.D. et al. Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia – uma revisão técnica. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v.64, p.155-161, 2005.

MALHOTRA, J. et al. *Acinetobacter indicus* sp. nov., isolated from a hexachlorocyclohexane dump site. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 62, n. Pt 12, p. 2883–2890, 2012.

MENDES, C.A.; BURDMANN, E. Polimixinas - revisão com ênfase na sua nefrotoxicidade. **Rev Assoc Med Bras**. v.55, p.752-759, 2009a.

MENDES, R.E. et al. Metallo- $\beta$ -lactamases. **J Bras Patol Med Lab**, v.42, n.2, p.103-113, 2006.

MENDES, R.E. et al. Emergence and widespread dissemination of OXA-23, -24/40 and -58 carbapenemases among *Acinetobacter* spp. in Asia-Pacific nations: report from the SENTRY Surveillance Programs. **Antimicrob Chemother**, v.63, n.1, p.55-59, 2009b.

MOSTACHIO, A.K. et al. High prevalence of OXA-143 and alteration of outer membrane proteins in carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. isolates in Brazil **Int J Antimicrob Agents**,v.39, n.5, p.396-401, 2012.

NAVON-VENEZIA, S.; LEAVITT, A.; CARMELI, Y. High tigecycline resistance in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **J Antimicrob Chemother**, v. 59, n.4, p. 772–774, 2007.

NEMEC, A. et al. *Acinetobacter parvussp. nov.*, a small-colony-forming species isolated from human clinical specimens. **Int J Syst Evol Microbiol**, v.53, n. Pt 5, p.1563-1567, 2003.

NEMEC, A. et al. *Acinetobacter beijerinckii* sp. nov. and *Acinetobacter gyllenbergii* sp. nov., haemolytic organisms isolated from humans. **Int J Syst Evol Microbiol**, v.59, n.Pt 1, p. 118-124, 2009

NEMEC, A. et al. *Acinetobacter ursingii* sp. nov. and *Acinetobacter schindleri* sp. nov., isolated from human clinical specimens. **Int J Syst Evol Microbiol**, v.51, n. Pt 5, p.1891–1899, 2010.

NEMEC, A. et al. Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*- *Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). **Res Microbiol**, v.162, n.4, p. 393-404, 2011.

NISHIMURA, Y.; T, INO.; IIZUKA, H. *Acinetobacter radioresistens* sp. nov. isolated from cotton and soil. **Int J Syst Bacteriol**, v.38, N.2, p.209–211, 1988.

OPAZO, A. et al. OXA-type carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* in South America. **J Infect Dev Ctries**, v. 6, n.4, p.311-316, 2012.

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

PELEG, A.Y.; SEIFERT, H.; PATERSON DL. *Acinetobacter baumannii* :emergence of a successful pathogen. **Clin Microbial Rev**, v. 21, n.3, p.538-582, 2008.

PONTES, V. M. O. et al. Profile of resistance of *Acinetobacter baumannii* to antimicrobial in the Semi-Intensive and Intensive Care Units of the General Hospital of Fortaleza. **Rev Bras Anal Clin**, v.38, p.123-126, 2006.

RAO, R.S. et al. Correlation between biofilm production and multiple drug resistance in imipenem resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Indian J Med Microbiol**, v.26, n.4, p.333 - 337, 2008.

RODLOFF, A.C.; GOLDSTEIN, E.J.C.; HERNÁNDES – TORRES, A. Two decades of imipenem therapy. **J Antimicrob Chemother**, v.58, n.5 p. 916-929, 2006.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D.B. *Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma*. São Paulo: Atheneu, 2005. 65-69 p.

RUNNEGAR, N. et al. Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a single institution over a 10-Year period. **J Clin Microbiol**, v. 48, n.11, p. 4051–4056, 2010.

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

SEIFERT, H. et al. Distribution of *Acinetobacter* Species on human Skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. **J Clin Microbiol**, v.35, n.11, p. 2819–2825, 1997.

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

TOGNIM, M. C. et al. Resistance trends of *Acinetobacter* spp. in Latin America and characterization of international dissemination of multi-drug resistant strains: five-year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Int J Infect Dis**, v. 8, n.5, p.284–291, 2004.

TURTON, J.F. et al. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the *bla*<sub>OXA-51-like</sub> carbapenemase gene intrinsic to this species. **J Clin Microbiol**, v. 44, n.8, p. 2974-2976, 2006.

UNAL, S.; GARCIA-RODRIGUEZ, J.A. Activity of meropenem and comparators against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. isolated in the MYSTIC Program, 2002–2004. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 53, n.4, p. 265–271, 2005.

VALENCIA, R. et al. Nosocomial outbreak of infection with pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a tertiary care university hospital. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v.30, n.3, p.257-263, 2009.

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

VANNECHOUTTE, M. et al. Description of *Acinetobacter venetianus* ex Di Cello et al. 1997 sp. nov. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 59, n.Pt 6, p. 1376–1381, 2009.

VAZ-MOREIRA, I. et al. *Acinetobacter rudis* sp. nov., isolated from raw milk and raw wastewater. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 61, n. Pt 12, p. 2837-2843, 2011.

VEGASA, E.Z.S.; NIEVES, B. *Acinetobacter* spp.: Aspectos microbiológicos, clínicos y epidemiológicos. **Rev Soc Ve Microbiol**, v.25, n. 2, 2005.

VERSALOVIC J. et al. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v.5, p.25-40, 1994.

VINCENT, J.L. et al. A pilot-controlled study of a polymyxin B-immobilized hemoperfusion cartridge in patients with severe sepsis secondary to intra-abdominal infection. **Shock**, v.23, n.5, p. 400-405, 2005.

WALTHER-RASMUSSEN, J.; HOIBY, N. OXA-type carbapenemases. **J Antimicrob Chemother**, v.57, n.3, p. 373–383, 2006.

WERNECK, J. S. et al. OXA-72- producing *Acinetobacter baumannii* in Brazil: a case report. **J Antimicrob Chemother**, v.66, n.2, p.452-454, 2011.

WOODFORD, N. et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. **Int J Antimicrob Agents**, v.27, n.4, p.351–353, 2006

ZAVASCKI, A.P. et al. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. **J Antimicrob Chemother**, v.60, n.6, p.1206-1215, 2007.



**ANEXO A – Setores e respectivos números de leitos do Hospital Regional Hans Dieter Schidt**

<b>Setores do Hospital</b>	<b>Nº de Leitos</b>
<b>CTI – Geral*</b>	10
<b>CTI – Cardíaca*</b>	10
<b>Cardiologia</b>	36
<b>Infectologia</b>	14
<b>Psiquiatria</b>	32
<b>Cirúrgico</b>	-
<b>Clínico – Posto 1</b>	73
<b>Clínico – Posto 2</b>	74
<b>Pronto Socorro</b>	-

\*CTI- Centro de Terapia Intensiva

**APÊNDICE A – Relação dos isolados identificados, o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos e presença das oxacilinases**

Registro Externo	Data de Coleta da Amostra	Setor do hospital	Sítio anatómico	AMI	ASB	CPM	CRO	CIP	GEN	IPM	MER	TZP	SXT	POL	TIG	OXAs	
C7_176104	25/06/2012		CTI	LB	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	23, 51
C6_225687	28/06/2012	INFECTOLOGIA	LB	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	23, 51
C6_223410	27/05/2012	Setor "G"	Sangue Total	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	23, 51
C7_173010	04/06/2012	CTI	LB	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	23, 51
C7_173011	05/06/2012	CTI	LB	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	23, 51
C7_175067	13/06/2012	CTI	LB	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	23, 51
C7_175605	21/06/2012	CTI	Sangue Total	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	NR	S	S	23, 51
C7_175605	26/06/2012	CTI	LB	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	NR	S	S	23, 51
C6_225893	29/06/2012	INFECTOLOGIA	Sangue Total	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	NR	S	S	23, 51
C6_214430	03/03/2012	Setor "G"	Secreção de ferida	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	NR	S	S	23, 51
C7_157165	10/06/2012	CTI	Escarro	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	23, 51
C6_214424	07/03/2012	Clínico	Secreção de ferida	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	NR	S	I	23, 51
C6_213551	07/03/2012	Clínico	Escarro	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	NR	S	I	23, 51
C8_264418	06/02/2012	Emergência P.S	LB	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	23, 51
C7_175826	23/05/2012	CTI	LB	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	23, 51
C6_188202	09/06/2011	Clínico	Sangue Total	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	23, 51
C7_174552	30/04/2012	CTI	LB	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	51
C7_175647	27/05/2012	CTI	LB	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	23, 51
C7_162263	17/06/2012	CTI	LB	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	23, 51
C7_161661	02/08/2011	CTI	LB	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	23, 51
C7_162267	18/06/2011	CTI	LB	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	23, 51
C7_168050	02/07/2012	CTI	Sangue Total	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	23, 51
C6_225638	04/07/2012	Setor "G"	LB	S	R	R	R	R	I	R	R	R	R	NR	S	I	23, 51
C7_176912	05/07/2012	CTI	Sangue Total	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	NR	S	S	23, 51
C7_176447	06/07/2012	CTI	Sangue Total	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	NR	S	S	23, 51
C7_162042	18/07/2012	CTI	LB	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	23, 51
C7_162264	17/06/2012	CTI	LB	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	23, 51
C6_225638	23/06/2012	Setor "G"	LB	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	NR	S	I	23, 51
C7_164901	20/12/2011	CTI	LB	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	NR	S	S	23, 51
C7_161575	12/12/2011	CTI	LB	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	23, 51
C7_166600	17/10/2011	CTI	LB	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	23, 51
C2_030823	06/10/2011	INFECTOLOGIA	LB	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	23, 51
C6_196431	01/10/2011	CARDÍACO	LB	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	NR	S	S	23, 51
C6_188911	03/09/2011	Clínico	Secreção de ferida	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	23, 51
C7_167812	12/10/2011	CTI	LB	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	23, 51
C7_166537	07/10/2011	CTI	LB	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	23, 51
C6_200377	28/09/2011	Clínico	LB	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	23, 51
C7_166187	13/10/2011	CTI	LB	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	23, 51
C7_174687	16/07/2012	CTI	LB	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	23, 51
C6_227976	25/07/2012	INFECTOLOGIA	LB	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	23, 51
C6_208139	23/12/2011	Clínico	Ponta de Cateter	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	23, 51
C2_030452	07/11/2011	Clínico	Secreção de ferida	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	23, 51
C7_158827	14/10/2011	CTI	LB	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	23, 51

Formatado: Esquerda: 2 cm, Direita: 3 cm, Largura: 29,7 cm, Altura: 21 cm

C7_160150	28/12/2011	CTI	LB	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	23,51
C6_205015	06/01/2012	Setor "G"	LB	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	NR	S	23,51
C7_161455	17/01/2012	CTI	LB	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	23,51
C7_171318	24/01/2012	CTI	Sangue Total	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	NR	S	23,51
C7_171004	29/05/2012	CTI	LB	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	23,51
C7_171771	20/02/2012	CTI	LB	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	23,51
C7_171325	23/01/2012	CTI	LB	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	Neg/Inc
C6_210750	06/02/2012	Clínico	Sangue Total	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	NR	S	23,51
C7_1717771	20/02/2012	CTI	LB	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	23,51
C7_177816	07/08/2012	CTI	LB	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	23,51
C7_175383	19/08/2012	CTI	Sangue Total	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	NR	S	23,51
C7_175383	19/08/2012	CTI	LB	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	NR	S	23,51
C7-175456	06/09/2012	CTI	Sangue Total	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	NR	S	23,51
C6_233149	06/09/2012	Setor "G"	Secreção de ferida	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	NR	S	Neg/Inc
C7_178841	11/09/2012	CTI	LB	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	NR	S	23,51
C7_178842	12/09/2012	CTI	Secreção de ferida	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	NR	S	Neg/Inc
C2_040607	16/09/2012	CTI	Líquido Abdominal	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	NR	S	23,51
C7_178866	14/09/2012	CTI	LB	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	23,51
C6_233718	03/10/2012	Clínico	Secreção de ferida	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	23,51
C2_040562	11/10/2012	Centro Cirurgico	Líquido perocárdico	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	Neg/Inc
C6_235740	17/10/2012	Clínico	Urina simples	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	23,51
C7_180261	23/10/2012	CTI	LB	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	S	Neg/Inc
C7_180262	23/10/2012	CTI	LB	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	S	23,51
C7_180262	23/10/2012	CTI	Sangue Total	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	S	Neg/Inc
C7_180263	23/10/2012	CTI	LB	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	S	23,51
C2_040710	30/10/2012	Centro Cirurgico	Secreção de ferida	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	NR	S	23,51
C7_180306	01/11/2012	CTI	LB	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	S	23,51
C6_237372	02/11/2012	Clínico	Urina simples	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	23,51
C6_233482	06/11/2012	Clínico	Sangue total	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	Neg/Inc
C6_233482	06/11/2012	Clínico	LB	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	Neg/Inc
C7_180384	07/11/2012	CTI	Urina simples	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	Neg/Inc
C7_180048	09/11/2012	CTI	Secreção de ferida	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	23,51
C6_237390	15/11/2012	Clínico	LB	S	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	S	23,51
C6_234229	17/11/2012	Clínico	Sangue Total	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	23,51
ay00134	12/12/2012	CTI	Sangue Total	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	23,51
az00488	12/12/2012	Emergencia P.S	Sangue Total	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	23,51
ay00654	04/01/2013	CTI	Urina simples	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	51
ba00843	20/12/2012	Clínico	LB	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	23,51
ay00619	18/12/2012	CTI	Urina simples	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	23,51
ba01464	08/01/2013	INFECTOLOGIA	Secreção de ferida	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	23,51
AY01275	11/01/2013	CTI	LB	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	23,51
BA02131	24/01/2013	INFECTOLOGIA	Sangue Total	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	23,51
ay01853	05/02/2013	Emergencia P.S	Sangue Total	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	23,51
bc05527	06/03/2013	CARDÍACO	Sangue Total	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	23,51
ay03095	13/03/2013	CTI	Sangue Total	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	Neg/Inc

ay03055	11/03/2013	CTI	LB	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	23, 51	
ay02372	23/02/2013	CTI	LB	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	51	
ay02649	25/02/2013	CTI	LB	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	23, 51	
BA05695	12/03/2013	CTI	LB	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	23, 51	
AY03716	21/03/2013	CTI	LB	R	R	R	NR	R	R	R	R	R	R	S	S	23, 51	
AY03716	21/03/2013	CTI	Urina simples	R	R	R	NR	R	R	R	R	R	R	S	S	23, 51	
BA11050	31/03/2013	Clínico	Sangue Total	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I	23, 51	
AY04442	10/04/2013	CTI	LB	R	R	R	NR	R	R	R	R	R	NR	S	I	23, 51	
BB07090	11/04/2013	Centro Cirurgico	Pleurostomia	R	R	R	NR	R	R	R	R	R	NR	S	I	23, 51	
BB06917	05/04/2013	Clínico	Secreção de ferida	S	R	R	R	R	R	R	R	R	NR	S	S	23, 51	
BC05961	14/04/2013	CTI	Urina simples	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I	23, 51	
BA13555	03/05/2013	Clínico	LB	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	23, 51	
BA14114	08/05/2013	INFECTOLOGIA	Ponta de Cateter	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	23, 51	
AY05848	12/05/2013	CARDÍACO	Secreção de ferida	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	23, 51	
AY04760	19/05/2013	CTI	LB	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	23, 51	
AY04732	20/05/2013	CTI	Líquido Abdominal	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	Neg/Inc	
AY06267	24/05/2013	CTI	LB	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	NR	S	S	23, 51
AY06274	25/05/2013	CTI	Sangue Total	S	I	R	R	R	S	R	R	R	NR	S	S	23, 51	
AY06325	25/05/2013	CTI	LB	S	I	R	R	R	S	R	R	R	NR	S	S	23, 51	
AY06339	26/05/2013	CTI	LB	S	R	R	R	R	R	R	R	R	NR	S	S	23, 51	
AY06685	05/06/2013	CTI	Urina simples	R	I	R	R	R	R	R	R	R	NR	S	S	23, 51	
BA16585	13/06/2013	Clínico	Sangue total	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	23, 51	
AY07043	13/06/2013	CTI	Sangue total	S	I	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	23, 51	
BA16884	17/06/2013	Clínico	Sangue total	S	I	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	23, 51	
AY07587	27/06/2013	CTI	LB	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	23, 51	
BB09511	31/07/2013	Centro Cirurgico	Líquido peritoneal	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	23, 51	
AY08856	31/07/2013	CTI	Sangue total	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	Neg/Inc	
AY08501	29/07/2013	CTI	LB	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	23, 51	
AY08211	07/07/2013	CTI	Sangue total	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	23, 51	
BA16425	05/07/2013	Clínico	LB	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	23, 51	

**LEGENDA:**

CTI -	Complexo de terapia intensiva	ASB -	Ampicilina-sulbactam	S -	Sensível
LB -	Lavado brônquico	CPM -	Cefepima	I -	Intermediário
		CRO -	Ceftriaxona	R -	Resistente
		CIP -	Ciprofloxacina	NR -	Não realizado
		GEN -	Gentamicina	Neg/Inc -	Negativo ou inconclusivo
		IPM -	Imipenem		
		MER -	Meropenem		
		TZP -	Piperacilina-tazobactam		
		SXT -	Sulfametoxazol-trimetopim		
		POL -	Polimixina		
		TIG -	Tigeciclina		

