

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

Daniela Betzler Cardoso Gomes

**ESTUDO DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS E A UM
DESINFETANTE E DETERMINAÇÃO DO POLIMORFISMO GENÉTICO EM
ISOLADOS CLÍNICOS E AMBIENTAIS DE *Acinetobacter baumannii* ORIUNDOS DE
UM HOSPITAL DO RIO DE JANEIRO: DO SURTO À ENDEMICIDADE**

Rio de Janeiro

2016

Daniela Betzler Cardoso Gomes

**ESTUDO DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS E A UM
DESINFETANTE E DETERMINAÇÃO DO POLIMORFISMO GENÉTICO EM
ISOLADOS CLÍNICOS E AMBIENTAIS DE *Acinetobacter baumannii* ORIUNDOS DE
UM HOSPITAL DO RIO DE JANEIRO: DO SURTO À ENDEMICIDADE**

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

Orientadoras: Dra. Maria Helena S. V. Bôas

Dra. Karyne Rangel Carvalho

Rio de Janeiro

2016

Daniela Betzler Cardoso Gomes

**ESTUDO DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS E A UM
DESINFETANTE E DETERMINAÇÃO DO POLIMORFISMO GENÉTICO EM
ISOLADOS CLÍNICOS E AMBIENTAIS DE *Acinetobacter baumannii* ORIUNDOS DE
UM HOSPITAL DO RIO DE JANEIRO: DO SURTO À ENDEMICIDADE**

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

Aprovado em: 25/01/2016

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Verônica Viana Vieira – Presidente (Fiocruz)

Prof. Dra. Raquel Regina Bonelli (UFRJ)

Prof. Dr. Robson de Souza Leão (UERJ)

Prof. Dra. Maria Helena Simões Villas Bôas (Fiocruz) – Orientadora

Prof. Dra. Karyne Rangel Carvalho - (Fiocruz) - Orientadora

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me dar forças em todos os momentos difíceis dessa longa jornada, me mostrando os caminhos a serem seguidos.

Aos meus familiares, em especial meus pais Sydney da S. Gomes e Luciene B. C. Gomes, e meu irmão Rodrigo B. C. Gomes, pelo apoio, ajuda e por sempre acreditarem no melhor de mim.

A todos os meus amigos, que estiveram presentes nos momentos de alegria e de tristeza, mesmo que de longe, sempre me acompanhando e me incentivando a alcançar meus objetivos.

As amigas que o Mestrado me deu de presente, em especial a Maria Luiza Cabral e Tamara Lobo, que passaram por essa jornada junto comigo, me apoiando e me dando forças. Sem vocês, com certeza essa jornada teria sido muito mais árdua. O mestrado acabou, mas a amizade é pra vida inteira!

A minha mais que amiga, parceira de laboratório, Gabrielle L. Genteluci, que não mediu forças pra me ajudar, esteve comigo em todos os momentos, muito obrigada pelo companheirismo, amizade e carinho, amizade como a sua não tem preço!

A toda a equipe do laboratório de Saneantes: Bruna Sabagh, Célia Romão, Christiane da Silveira, Gessy Fernandes, Felipe Oliveira e Priscila Dias. Obrigada pela compreensão, amizade, alegria e espírito de união, tornando nosso ambiente de trabalho tão agradável!

As minhas orientadoras Dra. Maria Helena S. Villas Bôas e Dra. Karyne Rangel Carvalho, muito obrigada por todo o apoio, aprendizado e amizade! Tudo ficou muito mais fácil graças à ajuda de vocês. Obrigada por acreditarem em mim e me mostrarem o quanto eu sou capaz.

Aos setores de Meio de Cultura e da Central de Esterilização, por serem tão solícitos e prestativos com os meios e materiais necessários e a equipe do laboratório de Identificação Bacteriana do departamento de Microbiologia do INCQS, pela ajuda com o empréstimo de materiais.

A Dra. Luciane Medeiros, da Seção de Esterilidade, Processos e Insumos do Departamento de Controle da Qualidade em Bio-Manguinhos, pela ajuda com a identificação por MALDI-TOF.

Ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, a Fiocruz, e a CAPES pelo apoio financeiro.

Obrigada a todos, que direta ou indiretamente, estiveram junto comigo durante essa jornada. “Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado, com certeza vai mais longe.”

RESUMO

As Infecções Relacionadas à Assistência a Saúde (IRAS) estão emergindo como um dos maiores desafios para a medicina, acarretando no aumento da morbidade, mortalidade dos pacientes e dos custos sociais e econômicos para as populações, sistemas de saúde e países. Entre a diversidade de micro-organismos causadores de IRAS, *Acinetobacter baumannii* tem se destacado como um importante patógeno oportunista, sendo responsável também por surtos hospitalares, particularmente em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs). Sua disseminação mundial é motivo de preocupação, vista na maioria das vezes de forma clonal dentro de instituições ou cidades, e às vezes entre os países. A significância clínica desse patógeno tem sido justificada por sua alta prevalência em epidemias e situações endêmicas, devido a sua capacidade de formar biofilmes em dispositivos hospitalares, por sua notável capacidade de adquirir resistência aos antibióticos e resistência à dessecação, contribuindo para a sua persistência no ambiente hospitalar. Esse estudo teve como objetivo investigar a diversidade genética, a presença de genes de resistência e os perfis de susceptibilidade a antimicrobianos e a um desinfetante hospitalar em isolados clínicos e ambientais de *A. baumannii* que foram coletados em um hospital do Rio de Janeiro em dois momentos diferentes: um surto ocorrido em 2011 e no período de 2014 a 2015. Todos os 27 isolados clínicos pertencentes ao surto ocorrido em 2011 foram confirmados como *A. baumannii*, além de 15 isolados obtidos de pacientes no período de 2014 a 2015 e 18 isolados ambientais de *A. baumannii* obtidos de superfícies da UTI do mesmo hospital. Os 60 isolados clínicos e ambientais de *A. baumannii* avaliados apresentaram altas taxas de resistência à maioria das classes de antimicrobianos testados, sendo 96% dos isolados pertencentes ao surto de 2011 multirresistentes, além de 88% dos isolados obtidos no período de 2014 e 2015. A percentagem de resistência aos carbapenêmicos foi superior a 80%. Além disso, 68% de todos os isolados foram resistentes à polimixina B. A expressão das enzimas oxacilinasas é o principal mecanismo responsável pela resistência de *A. baumannii* aos carbapenêmicos. A presença dos genes *bla_{OXA-51}* e *bla_{OXA-23}* foi detectada em 100% e 82% dos isolados estudados, respectivamente. Não foi detectada a presença dos genes *bla_{OXA-24}*, *bla_{OXA-58}* e *bla_{OXA-143}* em nenhum isolado. Além disso, a sequência de inserção *ISAba1* foi detectada em todos os isolados do presente estudo. Através da técnica de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) foram encontrados 16 genótipos diferentes de *A. baumannii*. Os genótipos A e B prevalentes no surto de 2011 se mantiveram presentes nos isolados coletados no período de 2014-2015. O gene *qacEΔ1*, responsável pela susceptibilidade reduzida a desinfetantes à base de quaternário de amônio, foi encontrado em 8% dos isolados. A avaliação da concentração inibitória mínima do desinfetante utilizado no hospital de estudo revelou que esses isolados de *A. baumannii* apresentaram altas taxas de concentração inibitórias mínimas, que podem estar relacionadas com a presença de integrons classe 1. A análise da susceptibilidade à dessecação evidenciou a capacidade de sobrevivência de 2 isolados por pelo menos 40 dias de incubação. A eficácia do desinfetante utilizado no hospital de estudo foi verificada e comprovada. No entanto, um isolado apresentou susceptibilidade reduzida ao desinfetante. A melhor forma de controle do desenvolvimento de IRAS é através de ações antecipatórias, para promover a proteção da saúde da população e evitar altos gastos públicos, associadas a mecanismos de controle sobre a Resistência Microbiana em Serviços de Saúde.

Palavras-chave: 1. *Acinetobacter baumannii*. 2. Infecções Relacionadas à Assistência a Saúde 3. Resistência a antimicrobianos e desinfetantes 4. PFGE. 5. Vigilância Sanitária

ABSTRACT

The Healthcare Associated Infections (HAI) are emerging as a major challenge for medicine, resulting in increased morbidity, mortality of patients and social and economic costs for populations, health systems and countries. Among the diversity of IRAS causing microorganisms, *Acinetobacter baumannii* has emerged as an important opportunistic pathogen, been responsible for nosocomial outbreaks, particularly in intensive care units (ICUs). Its global spread is cause for concern, seen most often through clones within institutions or cities, and sometimes between countries. The clinical significance of this pathogen has been justified by its high prevalence in epidemic and endemic situations, due to their ability to form biofilms in medical devices, for its remarkable ability to acquire antibiotic resistance and resistance to desiccation, contributing to their persistence in the hospital environment. This study aimed to investigate the genetic diversity, the presence of resistance genes and susceptibility profiles to antibiotics and to a hospital disinfectant in clinical and environmental isolates of *A. baumannii* collected in a hospital in Rio de Janeiro on two different occasions: an outbreak in 2011 and between 2014 and 2015 years. All 27 clinical isolates belonging to the outbreak in 2011 were confirmed as *A. baumannii*, besides 15 isolates from patients in the period of 2014-2015 and 18 *A. baumannii* environmental isolates obtained from the same hospital ICU surfaces. The 60 clinical and environmental isolates of *A. baumannii* evaluated showed high rates of resistance to most classes of antimicrobials tested, been multiresistant 96% of the isolates belonging to the outbreak of 2011 and 88% of the isolates obtained in 2014 and 2015 period. The percentage of carbapenem resistance was greater than 80%. Moreover, 68% of all isolates were resistant to polymyxin B. The expression of oxacilinases enzymes is the major mechanism responsible for resistance of *A. baumannii* to carbapenems. The presence of bla_{OXA-51} and bla_{OXA-23} genes was detected in 100% and 82% of the isolates, respectively. The presence of bla_{OXA-24}, bla_{OXA-58} and bla_{OXA-143} genes was not detected in any isolated. Furthermore, ISAbal insertion sequence was detected in all isolates in the present study. Using pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) technique, 16 different genotypes of *A. baumannii* were found. The prevalent genotypes A and B in the 2011 outbreak remained present in isolates collected in the 2014-2015 period. The *qacEAI* gene responsible for the reduced susceptibility to quaternary ammonium base disinfectants has been found in 8% of the isolates. The evaluation of minimum inhibitory concentration of the disinfectant used in the hospital of study revealed that *A. baumannii* isolates showed high rates of minimum inhibitory concentrations, which can be related to integrons class 1 presence. The analysis of susceptibility to desiccation showed the ability of 2 isolates to survive for at least 40 days of incubation. The effectiveness of the disinfectant used in the study hospital was verified and proven. However, one isolate showed reduced susceptibility to the disinfectant. The best way to development control of HAI is through proactive actions to promote health protection of the population and avoid high public spending, coupled with control mechanisms on the Microbial Resistance in Health Services.

Keywords: 1. *Acinetobacter baumannii*. 2. Healthcare Associated Infections 3. Resistance to antimicrobials and disinfectants 4. PFGE. 5. Health Surveillance

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Provas bioquímicas convencionais utilizadas para diferenciar espécies do gênero <i>Acinetobacter</i> (MURRAY et al, 2010, com modificações)..... | 31 |
| Tabela 2. Iniciadores utilizados nas reações de PCR..... | 37 |
| Tabela 3. Perfis de resistência de cada isolado clínico de <i>Acinetobacter baumannii</i> de 2011 a todos os antimicrobianos testados..... | 49 |
| Tabela 4. Perfis de resistência de cada isolado clínico e ambiental de <i>Acinetobacter baumannii</i> de 2014-2015 a todos os antimicrobianos testados..... | 51 |
| Tabela 5. Características apresentadas pelos isolados clínicos e ambientais selecionados para a realização do Método da Diluição de Uso e seus respectivos resultados..... | 58 |
| Tabela 6. Contagens das células viáveis recuperadas até o 40º dia de incubação dos isolados 188 SAN, 225 SAN e cepa ATCC 19606 em UFC/mL..... | 59 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Esquema de contaminação dos cilindros de aço inoxidável (carreadores) a partir de culturas estoque de <i>Staphylococcus aureus</i> INCQS n.º 00039 - ATCC n.º 6538, <i>Salmonella enterica</i> INCQS n.º 00028 - ATCC n.º 10708 e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> INCQS n.º 00025 - ATCC n.º 15442..... | 42 |
| Figura 2. Esquema do Método da Diluição de Uso, segundo estabelecido pela <i>Association of Official Analytical Chemists</i> – AOAC..... | 43 |
| Figura 3. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos pelo método de disco difusão dos isolados clínicos de <i>Acinetobacter baumannii</i> de 2011..... | 48 |
| Figura 4. Perfil de resistência as diferentes classes de antimicrobianos pelo método de disco difusão dos isolados clínicos de <i>Acinetobacter baumannii</i> de 2011..... | 48 |
| Figura 5. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos pelo método de disco difusão dos isolados clínicos e ambientais de <i>Acinetobacter baumannii</i> de 2014 e 2015..... | 50 |
| Figura 6. Perfil de resistência as diferentes classes de antimicrobianos pelo método de disco difusão dos isolados clínicos e ambientais de <i>Acinetobacter baumannii</i> de 2014 e 2015..... | 51 |
| Figura 7. Diferentes Concentrações Inibitórias Mínimas à Polimixina B apresentadas pelos isolados clínicos de <i>A. baumannii</i> do surto de 2011, isolados clínicos de 2014 e 2015 e isolados ambientais de 2014 e 2015..... | 52 |
| Figura 8. Diferenças de susceptibilidade à Polimixina B apresentadas entre os isolados clínicos de <i>A. baumannii</i> do surto de 2011 e os isolados clínicos de 2014 e 2015..... | 53 |
| Figura 9. Diferenças de susceptibilidade à Polimixina B apresentadas entre os isolados clínicos de <i>A. baumannii</i> do surto de 2011 e de 2014 e 2015 com os isolados ambientais de 2014 e 2015..... | 53 |
| Figura 10. Presença dos genes estudados em relação aos isolados de <i>A. baumannii</i> | 54 |
| Figura 11. Polimorfismo genético de isolados clínicos e ambientais de <i>A. baumannii</i> provenientes de um hospital do Rio de Janeiro e detectados através de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) após digestão do DNA cromossômico com endonuclease de restrição <i>Apal</i> | 55 |
| Figura 12. Percentual dos genótipos provenientes do surto de 2011 e dos isolados | |

| | |
|--|----|
| clínicos e ambientais coletados no período de 2014 e 2015..... | 56 |
| Figura 13. Concentração Inibitória Mínima do desinfetante frente aos isolados clínicos obtidos durante o surto de 2011..... | 57 |
| Figura 14. Concentração Inibitória Mínima do desinfetante frente aos isolados clínicos e ambientais obtidos em 2014 e 2015..... | 57 |

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

| | |
|---------|---|
| AbOmpA | Proteínas de Membrana Externa |
| AFLP | <i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> |
| Anvisa | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| AOAC | <i>Association of Official Analytical Chemists</i> |
| ARDRA | Análise do Perfil de Restrição do Produto Amplificado do 16S Rdna |
| ATCC | <i>American Type Culture Collection</i> |
| CCIH | Comissões de Controle de Infecções Hospitalares |
| CIM | Concentração Inibitória Mínima |
| CLSI | <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> |
| CMHCA | Caldo Müeller Hinton Cátion Ajustado |
| CNCIRAS | Comissão Nacional de Prevenção e Controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde |
| ELISA | <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> |
| ESBL | β -Lactamases de Espectro Estendido |
| INCQS | Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde |
| IRAS | Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde |
| MBLA | Metallo- β -Lactamases |
| MDR | Resistência a Múltiplas Drogas |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| PAV | Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica |
| PB | Pares de Bases |
| PCR | <i>Polimerase Chain Reaction</i> |
| PFGE | Eletroforese em Gel de Campo Pulsado |
| PLPs | Proteínas Ligadoras de Penicilinas |
| RDC | Resolução da Diretoria Colegiada |
| SCIH | Serviço de Controle de Infecção Hospitalar |
| SUS | Sistema Único de Saúde |
| TSB | Caldo Triptona de Soja |
| UFC | Unidades Formadoras de Colônias |
| UTI | Unidades de Terapia Intensiva |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 13 |
| 1.1 CARACTERÍSTICAS E IDENTIFICAÇÃO DO GÊNERO <i>Acinetobacter</i> | 13 |
| 1.2 ESPÉCIE <i>Acinetobacter baumannii</i> E SUA IMPORTÂNCIA CLÍNICA | 15 |
| 1.3 FATORES DE VIRULÊNCIA | 17 |
| 1.4 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS | 18 |
| 1.5 RESISTÊNCIA À DESSECAÇÃO | 22 |
| 1.6 RESISTÊNCIA AOS DESINFETANTES | 23 |
| 1.7 JUSTIFICATIVA | 27 |
| 2 OBJETIVO GERAL | 29 |
| 2.1 OBJETIVO ESPECÍFICOS | 29 |
| 3 METODOLOGIA | 30 |
| 3.1 ISOLADOS BACTERIANOS | 30 |
| 3.2 IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA | 30 |
| 3.2.1 Isolados clínicos | 30 |
| 3.2.2 Isolados ambientais | 31 |
| 3.3 AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS | 32 |
| 3.3.1 Técnica de disco difusão | 32 |
| 3.3.2 Concentração inibitória mínima de polimixina B frente a <i>A. baumannii</i> | 32 |
| 3.4 EXTRAÇÃO DO ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO GENÔMICO | 33 |
| 3.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) | 34 |
| 3.6 SEQUENCIAMENTO GENÉTICO | 36 |
| 3.6.1 Purificação do produto da PCR | 36 |
| 3.6.2 Determinação das sequências nucleotídicas | 37 |
| 3.7 ELETROFORESE EM GEL DE CAMPO PULSADO (PFGE) | 38 |
| 3.8 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DO DESINFETANTE HOSPITALAR | |

| | |
|--|----|
| FRENTE <i>A. baumannii</i> | 39 |
| 3.9 AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DOS ISOLADOS DE <i>A. baumannii</i> AO DESINFETANTE HOSPITALAR | 39 |
| 3.10 ANÁLISE DA SUSCEPTIBILIDADE DE <i>A. baumannii</i> À DESSECAÇÃO | 44 |
| 3.11 ASPECTOS ÉTICOS | 44 |
| 4 RESULTADOS | 46 |
| 4.1 ISOLADOS BACTERIANOS | 46 |
| 4.1.1 Isolados clínicos | 46 |
| 4.1.2 Isolados ambientais | 46 |
| 4.2 IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA | 46 |
| 4.3 AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS | 47 |
| 4.3.1 Técnica de disco difusão | 47 |
| 4.3.2 Concentração inibitória mínima à polimixina B em isolados clínicos e ambientais de <i>A. Baumannii</i> | 52 |
| 4.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) | 53 |
| 4.5 ELETROFORESE EM GEL DE CAMPO PULSADO (PFGE) | 54 |
| 4.6 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DO DESINFETANTE HOSPITALAR | 56 |
| 4.7 AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DOS ISOLADOS DE <i>A. baumannii</i> AO DESINFETANTE HOSPITALAR | 58 |
| 4.8 ANÁLISE DA SUSCEPTIBILIDADE DE <i>A. baumannii</i> À DESSECAÇÃO | 59 |
| 5 DISCUSSÃO | 60 |
| 6 CONCLUSÕES | 70 |
| 7 REFERÊNCIAS | 71 |

1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) utiliza o termo “Endemia Surda” como referência às Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), já que estas são identificadas como o efeito adverso de maior frequência durante a prestação de cuidados a saúde. Atualmente as IRAS estão emergindo como um dos maiores desafios para a medicina, acarretando no aumento da morbidade, da mortalidade dos pacientes e dos custos sociais e econômicos para as populações, sistemas de saúde e países (COELHO et al, 2011).

Entre a diversidade de micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos causadores de IRAS, *Acinetobacter baumannii* tem se destacado como um importante patógeno oportunista, sendo responsável também por surtos hospitalares, particularmente em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) (LIMA; OLIVEIRA; PAULA, 2008). Dados da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde do ano de 2012 apontaram *Acinetobacter* spp. como o 4º patógeno mais prevalente causador de infecções de corrente sanguínea primária em pacientes adultos hospitalizados em UTIs (ANVISA, 2014). A propagação de *A. baumannii* multirresistente é motivo de preocupação, vista na maioria das vezes de forma clonal dentro de instituições ou cidades, e às vezes entre diferentes países (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

A significância clínica desse patógeno tem sido justificada por sua alta prevalência em epidemias e situações endêmicas, devido a sua capacidade de formar biofilmes em dispositivos hospitalares, por sua notável capacidade de adquirir resistência aos antibióticos e resistência à dessecação, contribuindo para a sua persistência no ambiente hospitalar (ROBERTS; FINDLAY; LANG, 2001, PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008, DE BREIJ et al, 2010).

Devido a crescente relevância de *A. baumannii* como patógeno prevalente em IRAS torna-se fundamental o conhecimento da epidemiologia, das manifestações clínicas e dos mecanismos de resistência deste micro-organismo, permitindo estabelecer ferramentas que promovam o controle dessas infecções (SILVA, 2009).

1.1 CARACTERÍSTICAS E IDENTIFICAÇÃO DO GÊNERO *Acinetobacter*

O gênero *Acinetobacter* é caracterizado como cocobacilo Gram-negativo, não esporulado, não fermentador de glicose, imóvel, com metabolismo respiratório estritamente aeróbio, catalase-positiva e oxidase-negativa. As espécies do gênero crescem bem em meio de cultura sólido, rotineiramente utilizado em laboratórios de microbiologia clínica. No agar MacConkey formam colônias convexas, translúcidas e opacas e de coloração levemente rosa devido a pouca oxidação da lactose (BERGOGNE-BEREZIN; TOWNER, 1996, PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008). Até o momento, já foram descritas pelo menos 43 espécies diferentes do gênero, sendo 42 espécies com nomes reconhecidos oficialmente (LPSN BACTERIO.NET, 2015).

Esse gênero foi primeiramente descrito em 1911 pelo microbiologista holandês Martinus Willenm Beijerinck, que isolou um micro-organismo de amostra de solo, cultivando em um meio de cultura enriquecido com acetato de cálcio, o qual nomeou *Micrococcus calcoaceticus* (BAUMANN; DOUDOROFF; STANIER, 1968). Micro-organismos semelhantes foram descritos nas décadas seguintes e atribuídos a diversos gêneros e espécies, incluindo *Diplococcus mucosus*, *Micrococcus calcoaceticus*, *Alcaligenes haemolysans*, *Mima polymorpha*, *Moraxella lwoffii*, *Herellea vaginocola*, *Bacterium anitratum*, *Neisseria winogradskyi*, *Achromobacter anitratum* e *Achromobacter mucosus* (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

Em 1954, após 43 anos desde sua primeira descrição, Brisou e Prevot instituíram a nomenclatura *Acinetobacter*, em que “akinetos” deriva do grego com significado “não móvel”, com o intuito de diferenciá-los do gênero *Achromobacter*, formado por micro-organismos móveis. Somente em 1971 a existência do gênero *Acinetobacter* foi aceita pelo subcomitê de taxonomia da Família *Moraxellaceae*, que considerou os resultados da publicação de Baumann et al (1968), que também incluía neste mesmo gênero *Micrococcus calcoaceticus*, *Alcaligenes hemolysans*, *Mima polymorpha*, *Moraxella lwoffii*, *Herellea vaginocola* e *Bacterium anitratum* (BERGOGNE-BEREZIN; TOWNER, 1996).

Finalmente o gênero *Acinetobacter*, inicialmente classificado na família *Neisseriaceae*, foi inserido na família *Moraxellaceae*, possuindo a seguinte classificação taxonômica atualmente: Domínio Bacteria; Filo Proteobacteria; Classe Gammaproteobacteria; Ordem Pseudomonadales; Família *Moraxellaceae*; Gênero *Acinetobacter* (NCBI, 2015).

As espécies do gênero *Acinetobacter* estão amplamente disseminadas na natureza, sendo isoladas de solo, água, alimentos e, além disso, da microbiota normal de animais e humanos (FOURNIER; RICHET, 2006). Estudos revelaram que as espécies *Acinetobacter*

johnsonii e *Acinetobacter lwoffii* estavam entre as mais prevalentes isoladas de esgotos, habitats de aquicultura, peixes e rios (GUARDABASSI; DALSGAARD; OLSEN, 1999, XIN et al, 2014). Entre as espécies identificadas como colonizadoras da pele humana estão *A. johnsonii* e *Acinetobacter radioresistens*, e as que têm sido menos comumente associadas a enfermidades incluem *Acinetobacter lwoffii*, *Acinetobacter junii* e *Acinetobacter haemolyticus* (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008, TURTON et al, 2010). Segundo Peleg, Seifert e Paterson (2008), *Acinetobacter calcoaceticus* nunca esteve envolvido em doenças humanas graves.

A espécie *A. baumannii* tem sido considerada a mais relevante clinicamente, sendo responsável pelo maior número de surtos em IRAS e também a mais envolvida em relatos de resistência a múltiplas drogas. Mais recentemente *Acinetobacter pittii* e *Acinetobacter nosocomialis* aumentaram sua relevância clínica, estando envolvidas cada vez mais em relatos de surtos e resistência a antimicrobianos (YUM et al, 2002, VAN DEN BROEK et al, 2009, TURTON et al, 2010, CHUANG et al, 2011, CHIANG et al, 2012, KOH et al, 2012).

A identificação das espécies do gênero *Acinetobacter* através dos sistemas clássicos, assim como dos sistemas comerciais utilizados na bacteriologia, não é satisfatória em decorrência do crescente número de descrição de novas espécies e da grande similaridade entre elas, dificultando a constante atualização de métodos fenotípicos (DORTET et al, 2006). Deste modo, a ausência de critérios fenotípicos precisos para a diferenciação de espécies estreitamente relacionadas é considerada um dos principais problemas e traz um desafio à microbiologia médica, sendo as espécies pertencentes ao complexo *A. calcoaceticus* - *A. baumannii* (Acb) um exemplo disso (DIJKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007).

Diante disso, métodos genotípicos têm sido desenvolvidos e auxiliam na identificação das espécies de *Acinetobacter*. Entre eles estão: a análise do perfil de restrição do produto amplificado do 16S rDNA (ARDRA); a análise *fingerprint* de alta resolução por *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) e o sequenciamento do gene que codifica a subunidade β da RNA polimerase (*rpoB*) (TURTON et al, 2006b, DIJKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007, PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

1.2 ESPÉCIE *Acinetobacter baumannii* E SUA IMPORTÂNCIA CLÍNICA

Entre as diferentes espécies do gênero, *A. baumannii* é o de maior importância clínica, sendo responsável por IRAS e surtos hospitalares. Este micro-organismo faz parte do complexo *A. calcoaceticus*–*A. baumannii*, que é composto por quatro diferentes espécies: *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. pittii* e *A. nosocomialis* (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008, NEMEC et al, 2011). Até recentemente, sua identificação podia ser confirmada através da pesquisa do gene *bla_{OXA-51}*, intrínseco da espécie (HÉRITIER et al, 2005). Porém, recentemente esta carbapenemase foi descrita, codificada em plasmídeo, presente em isolados clínicos de *A. nosocomialis* e em um clone de genomoespécie “próximo ao 13TU” (LEE et al, 2009, 2012).

Entre os principais grupos envolvidos em infecções por *A. baumannii* estão os pacientes hospitalizados submetidos a procedimentos invasivos e imunodeprimidos, como pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), transplantados e em uso de neoplásicos (LIMA; OLIVEIRA; PAULA, 2008). Os doentes com queimaduras graves e os recém-nascidos também constituem grupos de risco para a colonização e posterior infecção pela espécie (DAVIS et al, 2005). Surtos de septicemia por *A. baumannii* têm ocorrido em UTIs neonatais e aumentos persistentes da incidência de bacteremias por este agente têm sido relatados (KANAFANI; KANJ, 2008, ANURADHA; RATHI; MATHUR, 2013).

No ambiente comunitário a incidência de infecções causadas por *A. baumannii* é baixa, sendo encontrados poucos relatos envolvendo casos de pneumonia comunitária por esse patógeno. Normalmente os casos de infecção estão associados a alguns fatores, como alcoolismo, tabagismo, diabetes e doença pulmonar obstrutiva crônica (FALAGAS et al, 2008). No entanto, casos envolvendo *A. baumannii* no ambiente comunitário têm sido relatados com crescente frequência na última década, sendo esse patógeno agente de pneumonias comunitárias em regiões próximas ao oceano Índico. Infecções em soldados feridos em batalhas no Iraque e Afeganistão e infecções em vítimas de desastres naturais também já foram relatadas (EVEILLARD; JOLY-GUILLOU, 2012).

Dentre as diferentes infecções nosocomiais por *A. baumannii* estão incluídas: bacteremia, meningite, endocardite, abscessos (abscesso cerebral, abscesso pulmonar, abscesso da tireoide), infecções secundárias de feridas causadas por trauma ou cirurgia e infecção do trato urinário. Sua maior prevalência se dá como agente da pneumonia nosocomial, particularmente pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) em pacientes internados em UTIs, devido a sua capacidade de aderência às células do epitélio respiratório transmitidos durante uso de ventilação mecânica, agravando a resposta clínica e aumentando o

tempo de internação dos pacientes (LEE et al, 2006, MARAGAKIS et al, 2008, TORRES et al, 2010).

Em muitas instituições de saúde, infecções endêmicas por *Acinetobacter* multirresistente demonstram perfis epidemiológicos complexos e coexistência de vários tipos diferentes de clones. A análise molecular de isolados através de técnicas como a eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) permite a identificação de surtos de infecção e o monitoramento da transmissão interinstitucional de *Acinetobacter* multirresistente (NEMEC; DIJKSHOORN; VAN DER REIJDEN, 2004, CORNAGLIA et al, 2007).

Utilizando a técnica de PFGE, Abbo et al (2005) encontraram 10 diferentes clones em estudo com 118 pacientes com infecção por *Acinetobacter* multirresistente. Outros investigadores utilizaram a técnica de PFGE para demonstrar a propagação interinstitucional de *Acinetobacter* resistente aos carbapenêmicos entre hospitais em Nova York, Argentina, Reino Unido e Península Ibérica (MANIKAL et al, 2000, BARBOLLA et al, 2003, DA SILVA et al, 2004, COELHO et al, 2006b). Gales et al (2004) utilizando a mesma técnica demonstraram a propagação de clones epidêmicos de *Acinetobacter* entre o Brasil e a Argentina.

1.3 FATORES DE VIRULÊNCIA

Durante muito tempo *A. baumannii* foi considerado um agente oportunista de baixa patogenicidade, pois em indivíduos saudáveis com elevada prevalência de colonização raramente causam patologias. No entanto, alguns fatores de virulência que possibilitam a sua sobrevivência no ambiente hospitalar e sua capacidade de causar doença têm sido descritos e podem justificar sua prevalência como patógeno em IRAS (KANAFANI; KANJ, 2008).

Entre os fatores que, acredita-se, podem desempenhar um importante papel nos mecanismos de colonização e patogênese nas infecções por *A. baumannii* estão: a capacidade de adquirir nutrientes essenciais, como ferro, em ambientes escassos; a produção de enzimas extracelulares com atividades lipolíticas e citolíticas; a ocorrência de proteínas de membrana externa (AbOmpA); a capacidade de formar biofilmes em superfícies bióticas e abióticas (NUCLEO et al, 2009) e a realização de *quorum sensing* (NIU et al, 2008).

Além dos fatores de virulência, a habilidade de *A. baumannii* sobreviver em superfícies secas e inanimadas associada com a capacidade em adquirir multirresistência aos

antimicrobianos contribui para o tempo de sobrevivência no ambiente hospitalar, possibilitando o desenvolvimento de IRAS (AYAN et al, 2003). Por sobreviver por longos períodos em superfícies tais como equipamentos médicos, macas, cateteres e equipamentos de ventilação mecânica (MCCONNELL; ACTIS; PACHON, 2013; FIESTER; ACTIS, 2013), *A. baumannii* é facilmente transmitido entre pacientes, o que favorece a ocorrência de surtos de infecções (GADDY; ACTIS, 2009; HOWARD et al, 2012).

1.4 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

Nas últimas décadas os isolados de *A. baumannii* têm apresentado altos índices de resistência aos antimicrobianos comumente utilizados como: penicilinas (benzilpenicilina, ampicilina, ticarcilina e piperacilina), cefalosporinas (ceftazidima e cefepima), aminoglicosídeos (amicacina, gentamicina e tobramicina) e fluorquinolonas (ciprofloxacino) (LEE et al, 2006). Este fato pode ser explicado pelo uso extensivo de terapias antimicrobianas em hospitais (ZARRILLI et al, 2004, PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008, DE BREIJ et al, 2010). Além disso, pacientes que permanecem hospitalizados por períodos prolongados podem ser colonizados pelo micro-organismo e carregá-lo por longos períodos sem sintomas visíveis (NUCLEO et al, 2009).

Logo, o tratamento com os carbapenêmicos (imipenem, meropenem) tornou-se necessário, entretanto, já têm sido observados índices crescentes de cepas resistentes a essas drogas (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008; HIGGINS et al, 2010; LLACA-DÍAZ et al, 2012; CORTIVO et al, 2015), através da combinação de vários mecanismos de resistência, incluindo a produção de β -lactamases, que pode estar associada com a perda de porinas de membrana externa e/ou superexpressão da bomba de efluxo ou, mais raramente, com a alteração das proteínas ligadoras de penicilinas (PLPs) (GUR et al, 2008).

As β -lactamases são enzimas bacterianas capazes de clivar o anel β -lactâmico, alterando a estrutura do antimicrobiano que, desta forma, não consegue ligar-se efetivamente às proteínas ligadoras PLPs, permitindo que a síntese da parede celular bacteriana continue normalmente (FORBES; SAHM; WEISSFELD, 1998). Até 2013, 1.300 diferentes β -lactamases já tinham sido descritas (BUSH, 2013).

A classificação das β -lactamases tem sido tradicionalmente baseada na característica funcional da enzima ou em sua estrutura primária. A classificação de Ambler baseia-se na

sequência de nucleotídeos e aminoácidos da enzima, e divide as enzimas em quatro classes moleculares: A, B, C e D (BUSH; JACOBY, 2010). O esquema de Bush-Jacoby-Medeiros baseia-se nas propriedades funcionais das enzimas, ou seja, nos perfis de substratos e inibidores. Esses dois sistemas classificam as β -lactamases em quatro grupos principais: β -lactamases de espectro estendido (ESBL), metalo- β -lactamases (MBLA), AmpC e OXA (BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995).

Diversas β -lactamases já foram descritas em *Acinetobacter*, porém as enzimas de classe B e D se apresentam em maior frequência e possuem atividade hidrolítica de carbapenêmicos, sendo denominadas também como carbapenemases (POIREL; NORDMANN, 2002). As β -lactamases de classe D (oxacilinas) são as principais responsáveis no processo de resistência por *A. baumannii* (SOHRABI et al, 2012) e têm emergido como as principais carbapenemases no mundo (SHAHCHERAGHI et al, 2011).

As oxacilinas apresentam o grupamento serina no seu sítio ativo, assim como as β -lactamases de classes A e C de Ambler, mas diferem na estrutura de aminoácidos. Por apresentarem uma grande variabilidade genotípica, Sanschagrin, Couture e Levesque (1995) classificaram a série OXA em cinco grupos de acordo com a similaridade genética (grupos I a V). A maioria destas enzimas confere resistência a cefepima, aztreonam e principalmente aos carbapenêmicos, sendo inibidas pelo ácido clavulânico (POIREL; NORDMANN, 2002).

Até o momento, seis desses subgrupos filogenéticos já foram descritos em *A. baumannii*, OXA-23-like, OXA-24-like, OXA-51-like, OXA-58-like, OXA-143-like e OXA-235 (POIREL; NAAS; NORDMANN, 2010, HIGGINS, 2013).

Oxacilinas OXA-51 são identificadas na maioria dos isolados de *Acinetobacter*, sendo intrínsecas a espécie *A. baumannii*. Essa característica fez com que o gene *bla_{OXA-51}* se tornasse um marcador genético para a identificação do micro-organismo em nível de espécie (TURTON et al, 2006a). Entretanto, estudos revelaram que este gene foi detectado em outras espécies do gênero *Acinetobacter* (LEE et al, 2009, 2012).

As enzimas OXA-51 têm baixa capacidade de hidrolisar penicilinas e carbapenêmicos e não são ativas contra cefalosporinas (HÉRITIER et al, 2005). Estudos verificaram que a sequência de inserção *ISAbal*, um promotor transcricional, contribui para a hiperexpressão de OXA-51, conferindo um alto nível de resistência aos carbapenêmicos (TURTON et al, 2006b).

As oxacilinas que conferem resistência aos carbapenêmicos encontradas em cepas de *A. baumannii* isoladas na maioria das regiões do mundo são as codificadas pelos genes *bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-40}* e *bla_{OXA-58}*, que podem estar localizados em plasmídeos ou no

cromossoma (POIREL; NORDMANN, 2006). Como descrito acima, também pode haver hiperexpressão de OXA-23-like, OXA-51-like e OXA-58-like quando *ISAbal* está presente adjacente ao gene codificador da enzima (NORDMANN; POIREL, 2002, TURTON et al, 2006b, RUIZ et al, 2007, DIJKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007). Associação semelhante foi descrita entre o gene *bla*_{OXA-51} e *ISAbal9*, *bla*_{OXA-23} e *ISAbal4* e entre *bla*_{OXA-58} e *ISAbal3* (FIGUEIREDO et al, 2009a, 2009b, BOGAERTS et al, 2008, POIREL; NORDMANN, 2006).

Vários estudos recentemente reportaram que o gene *bla*_{OXA-23} é o mais frequentemente identificado entre os genes codificadores de oxacilinas em *A. baumannii* (TOUATI et al, 2012, ABBOTT et al, 2013, AL-AGAMY et al, 2014b, CICEK et al, 2013, FOUAD et al, 2013). Estudo realizado por Fouad et al (2013) verificou a presença do gene *bla*_{OXA-23} em 100% dos seus isolados clínicos estudados. Surtos hospitalares envolvendo a oxacilinase OXA-23 têm sido descritos em diversos países como Argentina, Brasil, Cuba, França, Hong Kong, Itália, Japão, Kuwait, Cingapura, China e Espanha (MUGNIER et al, 2010).

O gene *bla*_{OXA-58} foi reportado em isolados de *A. baumannii* disseminados em diferentes países do mundo, incluindo Argélia, Argentina, Itália, Turquia, Reino Unido e Estados Unidos (COELHO et al, 2006a, TOUATI et al, 2012, ABBOTT et al, 2013, LOPES; AL-HASSAN; AMYES, 2012, METAN et al, 2013, MIGLIAVACCA et al, 2013).

Em 2009, Higgins et al verificaram a presença da oxacilinase OXA-143 em *A. baumannii*, nunca descrita até aquele momento, em cepas isoladas em uma UTI, em 2004 no Brasil. Análise molecular de *bla*_{OXA-143} revelou que o gene não se encontrava associado a sequências de inserção ou integrons. Além disso, a análise da sequência de aminoácidos revelou 88% de identidade com OXA-40, 63% de identidade com OXA-23 e 52% de identidade com OXA-58. Outro estudo, realizado por Antonio et al (2011), verificou a presença do gene *bla*_{OXA-143} em 58,3% dos isolados clínicos estudados, sendo um total de 36 isolados coletados no período entre 2004 e 2008 de diferentes pacientes hospitalizados em oito centros médicos das regiões Sudeste e Sul do Brasil. Todos os isolados que carregavam o gene eram de hospitais localizados em São Paulo.

Recentemente, um estudo realizado por Higgins et al (2013) descreveu um novo subgrupo nomeado OXA-235-LIKE, que inclui as classes OXA-235, OXA-236 e OXA-327, presente em isolados clínicos de *A. baumannii* isolados nos Estados Unidos e no México. Foi reportado que o subgrupo é semelhante à OXA-143-like, sendo essa última encontrada apenas no Brasil. A OXA-235-like mostrou atividade hidrolítica em penicilinas e carbapenênicos, mas não mostrou atividade contra cefalosporinas de espectro estendido, como observado em

outras OXAs. Em 2014, Girlich et al verificaram a presença de OXA-253 em um isolado clínico de *A. baumannii* pertencente à sequência tipo 113 (ST113), em um hospital de Minas Gerais, no Brasil. A enzima mostrou compartilhar uma identidade de aminoácidos com OXA-143 de 93,8%.

Com a emergência das oxacilinas, devido à ampla utilização dos antimicrobianos carbapenêmicos no ambiente hospitalar, subpopulações resistentes a esses agentes têm sido selecionadas e a frequência de *A. baumannii* resistentes a estas drogas tem aumentado consideravelmente (JONES et al., 2004, IKONOMIDIS et al, 2006, SCOTT; DEYE; SRINIVASAN, 2007, NORSKOV-LAURITSEN; MARCHANDIN; DOWZICKY, 2009). Neste caso, as polimixinas têm sido consideradas a única alternativa para o tratamento de infecções graves causadas por *A. baumannii* multirresistentes (GIAMARELLOU; ANTONIADOU; KANELLAKOPOULOU, 2008).

As polimixinas são antibióticos peptídeos cíclicos carregados positivamente que interagem com a porção de lipídeos A dos lipopolissacarídeos presentes na membrana externa de bactérias Gram-negativas, levando a desorganização e ruptura dessa membrana e permitindo a passagem do antimicrobiano através dela (HANCOCK; CHAPPLE, 1999). Em geral, a resistência às polimixinas ainda é incomum entre micro-organismos Gram-negativos não fermentadores. Um estudo recente apontou a excelente atividade da polimixina B contra bactérias Gram-negativas, incluindo aquelas que apresentam resistência aos carbapenêmicos (GALES; JONES; SADE, 2011, GIRARDELLO; GALES, 2012). Por outro lado, essa classe de antibióticos apresenta graves efeitos adversos, sendo os principais a nefrotoxicidade (principalmente insuficiência renal aguda) e a neurotoxicidade. Outros efeitos também são descritos, como por exemplo, alergias, febre e eosinofilia (MENDES; BURDMANN, 2009).

Na década de 1960, esse antibiótico foi amplamente utilizado no tratamento de infecções por *A. baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*, no entanto, foi substituído por outras drogas eficazes e menos tóxicas, como as cefalosporinas e os aminoglicosídeos (HORTON; PANKEY, 1982, DRABICK et al, 1998). Na década de 1990, com a emergência de isolados de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* resistentes a múltiplas drogas (MDR), o uso de polimixinas foi reestabelecido, especialmente no caso de isolados resistentes aos carbapenêmicos. O uso extensivo das polimixinas nos últimos anos tem levado ao surgimento de isolados de *A. baumannii* resistentes a essa droga, com relatos de taxas de resistência de 40% na Espanha e 30% na Coreia (KO et al, 2007, ARROYO et al, 2009).

No Brasil, um estudo com isolados coletados entre setembro de 1999 e dezembro de 2000, utilizando a técnica de microdiluição em caldo para avaliar a susceptibilidade dos

isolados de *A. baumannii* à polimixina B e considerando MIC ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$ para determinar a resistência a esse agente, relatou que quatro isolados apresentaram resistência. Esse mesmo estudo também verificou que através da técnica de disco difusão esses isolados apresentaram sensibilidade a polimixina B, revelando que essa técnica não é confiável para verificação da susceptibilidade de *A. baumannii* a essa droga, o que já havia sido relatado por outros estudos (REIS et al, 2003). Atualmente, as polimixinas têm sido consideradas a única opção para o tratamento de infecções graves causadas por *A. baumannii* MDR (PELEG; HOOPER, 2010, POGUE; COHEN; MARCHAIM, 2015).

A resistência bacteriana aos antibióticos é considerada uma ameaça para a saúde pública, sendo necessárias iniciativas nacionais e internacionais que tenham como foco estratégias de monitoramento e redução da resistência bacteriana através de estudos com isolados oriundos de todo o mundo. Além disso, ações como a conscientização da prescrição de antibióticos minimiza a utilização precoce de uma terapêutica antimicrobiana de largo espectro, reduzindo a seleção de bactérias resistentes e consequentemente o número de resistências bacterianas (BUTLER et al, 2007).

1.5 RESISTÊNCIA À DESSECAÇÃO

A habilidade de *A. baumannii* de sobreviver em superfícies secas e inanimadas aliada à capacidade em adquirir resistência aos antimicrobianos e biocidas favorece sua persistência no ambiente hospitalar. Diversos estudos já isolaram este micro-organismo de equipamentos de Raios-X, bancadas, leitos, ventiladores e sistemas de circulação de ar e também das mãos e *swabs* nasais do corpo clínico hospitalar (GIAMARELLOU; ANTONIADOU; KANELLAKOPOULOU, 2008).

Estudo realizado por Catalano et al (1999) revelou que *A. baumannii* pode ser isolado de grades de camas de hospital até nove dias após a saída do paciente infectado. Denton et al (2004) sugeriram que equipamentos hospitalares serviriam como um reservatório secundário para *A. baumannii*, mesmo que uma fonte ambiental não explique por si só a transmissão de uma estirpe epidêmica. Sua capacidade de resistência à dessecação permite que persistam em ambientes secos e inanimados por longos períodos, podendo chegar a 27 dias (ZARRILLI et al, 2004). Isto explica por que *A. baumannii* pode causar surtos epidêmicos prolongados,

havendo relatos de isolados endêmicos individuais de *A. baumannii* persistindo em hospitais por mais de três anos (JAWAD et al, 1998).

Essas características justificam o impacto clínico causado por este patógeno em IRAS, visto que há um aumento significativo no tempo de hospitalização dos pacientes e no uso extensivo de agentes antimicrobianos de amplo espectro, já que as cepas de *A. baumannii* tornam-se rapidamente multirresistentes aos agentes antimicrobianos, disseminam-se entre os pacientes e persistem no ambiente hospitalar, com difícil erradicação (HOWARD et al, 2012).

1.6 RESISTÊNCIA AOS DESINFETANTES

Produtos desinfetantes são rotineiramente utilizados nos estabelecimentos de assistência à saúde com o objetivo de controlar a transmissão de micro-organismos, já que são substâncias aplicadas em objetos inanimados com objetivo de eliminar micro-organismos patogênicos, embora não eliminem completamente os esporos bacterianos. Existem vários agentes químicos usados como desinfetantes e a escolha do agente depende do propósito do uso (WEBER; RUTALA; SICKBERT-BENNETT, 2007).

De acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada – RDC da Anvisa nº. 184, de 22 de outubro de 2001 (BRASIL, 2001), entende-se por produtos saneantes e afins, substâncias ou preparações destinadas à limpeza, desinfecção, desinfestação, desodorização/odorização de ambientes domiciliares, coletivos e/ou públicos, para utilização por qualquer pessoa, para fins domésticos, para aplicação ou manipulação por pessoas ou entidades especializadas e para fins profissionais.

O ambiente hospitalar é apontado como um importante reservatório de micro-organismos, especialmente os multirresistentes. Além disso, a presença de matéria orgânica favorece a proliferação de micro-organismos e o aparecimento de insetos, roedores e outros, que podem veicular esses micro-organismos nos serviços de saúde. O uso de técnicas incorretas de limpeza e desinfecção de superfícies e o manejo inadequado dos resíduos em serviços de saúde podem estar diretamente relacionados com a disseminação de patógenos multirresistentes e em casos de surtos hospitalares. Dessa forma, a desinfecção eficaz das superfícies é considerada uma das principais medidas de controle da disseminação de IRAS, de maneira que é importante que o desinfetante utilizado seja efetivo contra o patógeno alvo (ANVISA, 2010).

Segundo Rutala e Werber (2004), as superfícies limpas e desinfetadas conseguem reduzir em cerca de 99% o número de micro-organismos, enquanto as superfícies que foram apenas limpas os reduzem em 80%. Apesar de haver um risco mínimo de transmissão direta de infecção por meio das superfícies, a principal forma de transmissão dos micro-organismos é por contaminação cruzada, através das mãos de profissionais de saúde e de instrumentos ou produtos que poderão ser contaminados ao entrar em contato com essas superfícies e, posteriormente, contaminar pacientes ou outras superfícies (ANSI/AAMI, 2006).

Dentre os fatores que favorecem a contaminação do ambiente dos serviços de saúde, podemos citar: mãos dos profissionais de saúde em contato com as superfícies, manutenção de superfícies úmidas, molhadas e empoeiradas, condições precárias de revestimentos e manutenção de matéria orgânica (GARNER, 1996; OLIVEIRA, 2005). A presença de sujidades, principalmente matéria orgânica de origem humana, pode servir como substrato para a proliferação de micro-organismos ou favorecer a presença de vetores, que podem carrear passivamente esses agentes. Daí a importância da limpeza e desinfecção rápida de qualquer área com presença de matéria orgânica, independentemente da área do hospital (PELCZAR, 1997; FERNANDES, 2000).

Estudos têm demonstrado a presença de micro-organismos multirresistentes aos antimicrobianos em superfícies de leitos e equipamentos após limpeza e desinfecção inapropriadas (NOSKIN et al, 2000, RAY et al, 2002, SAMPLE et al, 2002, DENTON et al, 2004). Entre as medidas utilizadas para evitar que superfícies sejam fontes de contaminação nos serviços de saúde, destacam-se: evitar atividades que favoreçam o levantamento das partículas em suspensão, como o uso de aspiradores de pó (permitidos somente em áreas administrativas); não realizar a varredura seca nas áreas internas dos serviços de saúde; superfícies (mobiliários em geral, pisos, paredes e equipamentos) devem estar sempre limpas e secas; remover rapidamente matéria orgânica das superfícies; isolar áreas em reformas ou em construção, utilizando tapumes e plástico (HINRICHSEN, 2004, ASSAD; COSTA, 2010).

As superfícies em serviços de saúde compreendem: mobiliários, pisos, paredes, divisórias, portas e maçanetas, tetos, janelas, equipamentos para a saúde, bancadas, pias, macas, divãs, suporte para soro, balança, computadores, instalações sanitárias, grades de aparelho de condicionador de ar, ventilador, exaustor, luminárias, bebedouro, aparelho telefônico, entre outros (BRASIL, 1994, PREFEITURA, 2006). O uso de desinfetantes fica reservado apenas para as superfícies que contenham matéria orgânica ou por indicação do Serviço de Controle de Infecção Hospitalar (SCIH), sendo que todos os produtos saneantes

utilizados devem estar devidamente registrados ou notificados na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa).

É importante que seja feita uma avaliação criteriosa da real necessidade do uso do produto saneante, evitando seu uso indiscriminado. Além disso, a escolha do produto deve ser baseada nos seguintes critérios: a natureza da superfície a ser limpa ou desinfetada, possibilidade de corrosão da superfície, tipo e grau de sujidade e sua forma de eliminação, tipo de contaminação e a sua forma de eliminação (micro-organismos envolvidos com ou sem matéria orgânica presente), grau de toxicidade do produto, princípio ou componente ativo, tempo de contato para a ação, possibilidade de inativação perante matéria orgânica, estabilidade frente às alterações de luz, umidade, temperatura de armazenamento e matéria orgânica, entre outros (ANVISA, 2010).

As superfícies mais próximas dos pacientes, e aquelas que são muito manipuladas, como as grades de leito, mesas de cabeceira e macas, devem ter uma atenção mais especial. Os desinfetantes que são comumente utilizados para esse propósito e que podem ser aplicados nas imediações de pacientes são normalmente baseados em ingredientes ativos de superfície, tais como o quaternário de amônio e o monopersulfato de potássio (REICHEL et al, 2014).

Os compostos quaternários de amônio são substâncias com atividade bactericida, virucida (somente contra vírus lipofílicos ou envelopados) e fungicida. Não apresentam ação tuberculicida. Além disso, são pouco corrosivos e têm baixa toxicidade. Seu mecanismo de ação é baseado na inativação de enzimas produtoras de energia, desnaturação de proteínas e quebra da membrana celular. Possuem como desvantagem o fato de poderem ser inativados em presença de matéria orgânica. Já o monopersulfato de potássio tem como características ter atividade de amplo espectro, ser ativo na presença de matéria orgânica e não ser corrosivo para metais. Sua desvantagem está no fato de ser capaz de reduzir a contagem micobacteriana em 2 a 3 log¹⁰ somente após 50 minutos de exposição em concentração de 3% (ANVISA, 2010).

Apesar dos cuidados com o uso indiscriminado de desinfetantes, de modo a evitar o surgimento de micro-organismos resistentes a esses agentes, estudos têm revelado que patógenos Gram-negativos têm desenvolvido estratégias de resistência aos desinfetantes, dificultando sua erradicação no ambiente hospitalar. Compostos quaternários de amônio e sulfonamidas são exemplos de compostos cujos genes responsáveis pela sua resistência encontram-se amplamente difundidos (WALSH et al, 2005).

Dentre os diversos fatores que contribuem para a resistência bacteriana aos desinfetantes, podem ser destacados: (I) a formação de biofilme (McDONNELL; RUSSELL,

1999), o qual é também um determinante da resistência bacteriana às drogas antimicrobianas; (II) produção de bombas de efluxo, que diminuem a concentração intracelular de antibióticos e biocidas excretando-os para fora da célula, com isso tornando o micro-organismo menos suscetível aos mesmos (KÜCKEN; FEUCHT; KAULFERS, 2000); (III) mutação celular ou aquisição de elementos genéticos móveis de DNA, que codificam enzimas e outras proteínas que medeiam a movimentação do DNA dentro de genomas ou entre bactérias. Assim, a mobilidade genética pode levar à disseminação epidêmica da resistência às diferentes classes de antibióticos e biocidas entre espécies (McDONNELL; RUSSELL, 1999).

Um dos principais mecanismos de resistência aos desinfetantes ocorre através da aquisição de Integrons, que são famílias de elementos genéticos móveis capazes de se integrar em determinadas regiões do DNA e expressar genes de resistência a antibióticos e desinfetantes. Eles são compostos por duas sequências conservadas (5'CS e 3'CS) e por uma região variável. A região 5'CS é constituída pelo gene *intI*, que codifica a integrase intI, e pelo sítio de recombinação *attI* (PARTRIDGE et al, 2009). Já na região conservada 3'CS estão presentes os genes *qacEΔ1* e *sulI*, que conferem, respectivamente, resistência aos desinfetantes à base de compostos quaternários de amônio e às sulfonamidas (WALSH et al, 2005).

As sequências de aminoácidos das integrases intI são utilizadas para dividir os integrons em classes, sendo os carreadores de intI1 definidos como classe 1, de intI2 como classe 2, de intI3 como classe 3, etc (PARTRIDGE et al, 2009). Cinco classes de integrons já foram descritas, podendo-se destacar os integrons de classe 1 como mais prevalentes, os quais os genes *qacEΔ1* e *sulI* encontram-se amplamente difundidos e sendo frequentemente detectados em bactérias Gram-negativas (WALSH et al, 2005, PARTRIDGE et al, 2009).

Rajamohan, Srinivasan e Gebreyes (2010) verificaram a presença do gene *qacE* em 41% dos seus isolados clínicos de *A. baumannii*. Além disso relataram uma grande evidência da ocorrência de bombas de efluxo, onde através da utilização de inibidores de bomba de efluxo foi visto o aumento da susceptibilidade das cepas aos desinfetantes, diminuindo suas concentrações inibitórias mínimas. O gene *adeJ*, responsável por codificar a proteína responsável pelo efluxo, foi pesquisado e detectado em todos os isolados. Por fim, eles demonstraram que a deleção do gene *adeJ* resultou em um aumento da susceptibilidade aos diferentes desinfetantes.

Esses dados mostram a importância da aplicação correta dos desinfetantes, na concentração e tempo de contato determinados no rótulo do produto, evitando assim a pressão seletiva e o aumento de bactérias resistentes a esses agentes. Investigadores frequentemente

relatam a interrupção da transmissão da infecção após o reforço das normas de controle e prevenção de infecções já existentes, como a higienização das mãos, precauções padrão e uma minuciosa limpeza e desinfecção do ambiente (KRANIOTAKI et al, 2006, WILKS et al, 2006, ZARRILLI et al, 2007). Para isso, é necessário treinamento de funcionários e conscientização dos impactos do uso incorreto de antissépticos e desinfetantes, além do incentivo de medidas que previnam infecções cruzadas, como a lavagem das mãos e uso de álcool gel após a limpeza (ROMÃO, 1996, COZAD; JONES, 2003).

1.7 JUSTIFICATIVA

De acordo com os relatórios da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde, *Acinetobacter* spp. foi um dos patógenos mais prevalentes isolado de pacientes hospitalizados em 2012 (ANVISA, 2014). Sua notável capacidade de aquisição de fatores que promovem resistência a uma ampla variedade de agentes antimicrobianos e a dificuldade de sua erradicação durante a desinfecção ou antibioticoterapia em hospitais, exibindo taxas crescentes de resistência, são fatores responsáveis pela prevalência desse patógeno em IRAS. Ainda assim, existem poucos estudos que avaliam a susceptibilidade a antimicrobianos e a desinfetantes usados em ambiente hospitalar, principalmente no Brasil.

As IRAS constituem grave problema de Saúde Pública mundial, sendo um desafio ao Sistema de Saúde (DAI et al, 2010). O processo histórico de ocorrência de IRAS, seu conceito e métodos de controle e prevenção conservam uma relação estreita com a história da atenção à saúde. A primeira legislação relacionada ao tema, hoje revogada, surgiu em 1983, com a Portaria n° 196, publicada pelo Ministério da Saúde, que já estabelecia a manutenção de Comissões de Controle de Infecções Hospitalares (CCIH) em todos os hospitais. Com a criação do Sistema Único de Saúde (SUS), através da lei n° 8.080 de 1990, surgia uma estruturação mais efetiva dos cuidados com a saúde, visto que passa a ser responsabilidade do Estado “a assistência às pessoas por intermédio de ações de promoção, proteção e recuperação da saúde, com a realização integrada das ações assistenciais e das atividades preventivas”. Essa efetividade se tornou mais objetiva após a criação da Anvisa em 1999, como um instrumento para realização dessas ações. A medida mais recente implementada, através da Portaria n° 1218, foi a criação da Comissão Nacional de Prevenção e Controle de Infecções

Relacionadas à Assistência à Saúde (CNCIRAS) com a finalidade de assessorar a Diretoria Colegiada da Anvisa na elaboração de diretrizes, normas e medidas para prevenção e controle de IRAS (ANVISA, 2012).

Apesar das exigências legais e normativas e de sua reconhecida importância, acredita-se que o sistema de saúde não tenha conseguido incorporar as ações de prevenção e controle de IRAS, visto que vários autores apresentam realidades locais e regionais, constatando que em grande parte dos hospitais estudados não são observadas iniciativas que possibilitem o desenvolvimento de programas que resultem na redução dos riscos do aparecimento de IRAS. Sendo assim, estudos sobre a prevalência de micro-organismos envolvidos em IRAS, bem como os fatores que permitem sua permanência nesses ambientes são fundamentais para a evolução das ações de prevenção e para o desenvolvimento de estratégias de controle dessas infecções.

O presente trabalho se dedica a estudar esses aspectos, com ênfase em uma percepção temporal, envolvendo isolados de *A. baumannii* com 3 a 4 anos de diferença, de pacientes infectados provenientes de um surto e de isolados clínicos endêmicos, bem como isolados ambientais coletados na Unidade de Tratamento Intensivo do hospital de estudo. Acreditamos que investigar a dinâmica de evolução e persistência deste patógeno poderá avançar na compreensão do seu potencial de disseminação e persistência, fornecendo informações que viabilizem a realização de ações antecipatórias, para promover a proteção da saúde da população e evitar altos gastos públicos, bem como desenvolver mecanismos de controle sobre a Resistência Microbiana em Serviços de Saúde.

2 OBJETIVO GERAL

Investigar a diversidade genética, a presença de genes de resistência e os perfis de susceptibilidade a antimicrobianos e a um desinfetante hospitalar em isolados clínicos e ambientais de *Acinetobacter baumannii*. Esses isolados foram coletados em um hospital do Rio de Janeiro em dois momentos diferentes: um surto ocorrido em 2011 e no período de 2014 a 2015.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar e/ou confirmar a identificação, através de métodos fenotípicos e genotípicos, de isolados clínicos e ambientais de *A. baumannii* oriundos de um hospital do Rio de Janeiro;
- Pesquisar a presença dos genes das oxacilinas *bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-24}*, *bla_{OXA-51}*, *bla_{OXA-58}* e *bla_{OXA-143}* e da sequência de inserção *ISAbal* através da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e sequenciamento;
- Avaliar o polimorfismo genético dos isolados através da técnica de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE);
- Determinar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e a Concentração Inibitória Mínima (CIM) para polimixina B;
- Verificar a presença do gene *qacEΔ1*;
- Determinar o perfil de susceptibilidade dos isolados de *A. baumannii* a um desinfetante hospitalar através das técnicas da Concentração Inibitória Mínima e do Método da Diluição de Uso;
- Analisar a susceptibilidade dos isolados à dessecação.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ISOLADOS BACTERIANOS

Foi estudado um total de 60 isolados de *Acinetobacter baumannii* coletados em um hospital da rede pública do município do Rio de Janeiro. Entre esses, 27 isolados clínicos foram envolvidos em um surto ocorrido no período de março a junho de 2011, e o restante foi coletado no período de 2014 a 2015, sendo 15 isolados clínicos e 18 isolados ambientais.

3.2 IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA

3.2.1 Isolados clínicos

Os isolados foram identificados inicialmente no laboratório do hospital de origem com o auxílio do sistema automatizado VITEK 2 (Bio Mérieux Inc., Hazelwood, Mo). No Setor de Saneantes do Departamento de Microbiologia do INCQS, após verificação da pureza das culturas, foram realizados os seguintes testes para confirmação de identificação: observação das características morfo-tintoriais após coloração pelo método de Gram, teste da produção da citocromo oxidase, teste de oxidação-fermentação da glicose em meio de Hugh-Leifson, utilização do Citrato (Simmons), crescimento a 42°C, teste de Motilidade e produção de Indol, segundo Murray et al (2007). A **Tabela 1** exhibe os resultados dos testes bioquímicos apresentados por diferentes espécies do gênero *Acinetobacter*.

Para a identificação em nível de espécie foram realizados os seguintes métodos: Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) do gene *rpoB*, que codifica a subunidade β da RNA polimerase (GUNDI et al, 2009), e posterior sequenciamento e análise do gene e também a PCR do gene *bla_{OXA-51}* (WOODFORD et al, 2006).

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

3.2.2 Isolados ambientais

A fim de realizar a pesquisa da presença de *A. baumannii*, as seguintes superfícies do setor de Terapia Intensiva do hospital estudado foram analisadas: cabeceiras de leitos, mesas de cabeceira, grades de leitos, bancada central do setor, estetoscópios, pias e maçanetas. Para tal, duas coletas foram feitas (com intervalo de 1 mês) através de esfregação em superfície com *swab* estéril umedecido em solução salina a 0,85%. O setor possui uma bancada central, 4 pias e 10 boxs, cada um com um leito e uma mesa de cabeceira, além de outros equipamentos. Ao todo foram coletadas 77 amostras de superfícies.

As amostras coletadas foram semeadas em ágar MacConkey e as placas foram incubadas a 37°C por 24h. A partir do crescimento bacteriano, as colônias suspeitas foram selecionadas e foram realizados a observação das características morfo-tintoriais após coloração pelo método de Gram, o teste da produção da citocromo oxidase, teste de oxidação-fermentação da glicose em meio de Hugh-Leifson, a utilização do Citrato (Simmons), o crescimento a 42°C, o teste de Motilidade e produção de Indol, segundo Murray et al (2007). A confirmação da identificação dos isolados foi realizada através da PCR do gene *bla_{OXA-51}* (WOODFORD et al, 2006), além da técnica de espectrometria de massa MALDI-TOF MS (VITEK®) realizada em colaboração com a Dra. Luciane Martins Medeiros da Seção de Esterilidade, Processos e Insumos do Departamentos de Controle da Qualidade em Bio-Manguinhos (SEPIN/DEQUA/Bio-Manguinhos).

Tabela 1. Provas bioquímicas convencionais utilizadas para diferenciar espécies do gênero *Acinetobacter* (MURRAY et al, 2010, com modificações).

| Micro-organismos | MOT | CIT | INDOL | OF-G | OXI | Cresc. a 42°C |
|-------------------------|-----|-----|-------|----------|-----|---------------|
| <i>A. baumannii</i> | Neg | + | neg | O | Neg | + |
| <i>A. calcoaceticus</i> | Neg | + | neg | O | Neg | Neg |
| <i>A. haemolyticus</i> | Neg | + | neg | Inerte/O | Neg | Neg |
| <i>A. lwoffii</i> | Neg | neg | neg | Inerte | Neg | Neg |

MOT, teste de motilidade; CIT, utilização do citrato (Simmons); INDOL, produção de indol; OF-G, oxidação e fermentação da glicose em meio de Hugh-Leifson; OXI, teste da produção da citocromo oxidase; Cresc. a 42°C, crescimento a 42°C.

3.3 AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

3.3.1 Técnica de disco difusão

Os isolados foram submetidos ao teste de susceptibilidade aos antimicrobianos pela técnica de disco difusão, conforme recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2013), descritas a seguir. A partir de culturas recentes, as colônias foram suspensas em soluções salina a 0,85% estéreis, com turvação correspondente ao grau 0,5 da escala McFarland ($\sim 1,5 \times 10^8$ células/mL). Essas suspensões foram semeadas, com o auxílio de um *swab*, de forma confluyente em três direções diferentes em placas contendo meio de cultura agar Mueller-Hinton (Difco®). Em seguida os discos contendo antimicrobianos foram colocados sobre a superfície do meio e as placas incubadas a 37°C por 20 a 24 horas. Após este período foi medido o diâmetro dos halos formados em cada disco e consultada a tabela disponível do CLSI (2015). O controle de qualidade do teste foi realizado utilizando-se as seguintes cepas de referência: *Escherichia coli* INCQS n° 00033 (ATCC n° 25922) e *P. aeruginosa* INCQS n° 00099 (ATCC n° 27853).

Os antibióticos utilizados foram: amicacina (30µg), gentamicina (10µg), ampicilina-sulbactam (10µg/10µg), piperacilina-tazobactam (100µg/10µg), cefotaxima (30µg), ceftazidima (30µg), cefepima (30µg), ciprofloxacina (5µg), imipenem (10µg) e meropenem (10µg) (Sensifar®).

3.3.2 Concentração inibitória mínima de polimixina B frente a *A. baumannii*

Para a verificação da concentração inibitória mínima de Polimixina B (Eurofarma®) frente aos isolados clínicos e ambientais foi realizada a técnica de microdiluição em caldo estabelecida pelo CLSI (CLSI, 2015). Após o crescimento dos isolados a 37°C por 24h em meio ágar nutriente foram realizadas suspensões bacterianas em solução salina estéril a 0,85% compatíveis ao grau 0,5 da escala de McFarland ($\sim 1,5 \times 10^8$ células). Posteriormente, as suspensões foram diluídas na escala de 1:100 em caldo Müller Hinton cátion ajustado

(CMHCA) pH 7,3, de modo a se obter uma concentração final de células de $1,8 \times 10^6$ UFC/mL.

Foram escolhidas para serem testadas as seguintes concentrações antimicrobianas: 64 µg/mL, 32 µg/mL, 16 µg/mL, 8 µg/mL, 4 µg/mL, 2 µg/mL, 1 µg/mL, 0,5 µg/mL, 0,25 µg/mL e 0,125 µg/mL e o isolado foi considerado resistente quando apresentou $CIM \geq 4$ µg/mL.

Utilizando uma placa de microtitulação de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) (Costar®), 50 µl de CMHCA foram aliquotados em todos os poços da microplaca, exceto nos poços da coluna 1 (A1-A8). Posteriormente, 100 µl da maior concentração do antimicrobiano (64 µg/mL) foram colocados nos poços da coluna 1. Depois, 50 µl foram retirados do 1° poço (A1) e transferidos para o 2° poço (A2). Em seguida, após homogeneização com a pipeta, 50 µl foram retirados do 2° poço e transferidos para o 3° poço (A3). O procedimento foi repetido sucessivamente até o poço A11, e em seguida foi repetido nas linhas seguintes (B-H), de modo que todos os poços ficaram com sua respectiva concentração de antimicrobiano. Por fim, a coluna 11 ficou com 100 µl e foi utilizado como controle de esterilidade da diluição do antimicrobiano, e a última coluna da microplaca (12) foi utilizada como controle do crescimento bacteriano, tendo sido inoculados 50 µl de CMHCA e 50 µl de suspensão bacteriana diluída.

Após a inoculação das diferentes concentrações antimicrobianas na placa, foram inoculados 50 µl da suspensão bacteriana diluída em cada poço da microplaca, sendo um micro-organismo diferente em cada linha (A-H). A inoculação bacteriana dos poços foi realizada no intervalo de, no máximo, 30 minutos e posteriormente as placas foram homogeneizadas sobre a bancada em movimento rotatório e incubadas por 24 h a 37°C. A leitura foi realizada através de inspeção visual, onde a 1ª concentração que não apresentou crescimento bacteriano (turvação do meio) foi considerada a concentração inibitória mínima. As cepas de referência *E. coli* INCQS n° 00033 (ATCC n° 25922) e *P. aeruginosa* INCQS n° 00099 (ATCC n° 27853) foram utilizadas como controle do ensaio.

3.4 EXTRAÇÃO DO ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO GENÔMICO

O DNA genômico foi extraído utilizando o kit *Dneasy Tissue Kit* (Qiagen, Inc, Valencia, CA), de acordo com as instruções do fabricante, descritas a seguir. Os isolados do estudo foram cultivados em caldo TSB e incubados por 24 h a 37°C com agitação. Em

seguida, 1.000 µL foram transferidos para um microtubo de 1,5 mL, o qual foi centrifugado a 24.000 g por 10 min. O sedimento foi suspenso em 180 µL de tampão ATL, acrescido de 36 µL de lisozima (50 mg/mL) e homogeneizado em agitador magnético e incubado por 30 min a 37°C. Depois da incubação, foram adicionados 20 µL de proteinase K (20 mg/mL em tampão ES) e 200 µL de tampão AL e uma nova incubação foi realizada a 56°C por 1 h. Posteriormente foram adicionados 2 µL de RNase (10 mg/mL) e o tubo foi incubado a 37°C por 30 min. Em seguida, o tubo foi centrifugado brevemente e 200 µL de álcool etílico (96-100%) foram adicionados. Uma nova breve centrifugação foi então realizada. Depois, todo o conteúdo do tubo foi cuidadosamente aplicado à coluna QIAmp acoplada a um tubo coletor de 2 mL fornecido pelo Kit e o tubo centrifugado a 43.000 g por 1 min. A seguir, a coluna QIAmp foi colocada em um novo tubo coletor e o tubo contendo o filtrado foi descartado. Posteriormente, 500 µL de tampão AW1 foram acrescentados e o tubo centrifugado a 43.000 g por 1 min. A coluna QIAmp foi então retirada e colocada em um novo microtubo de 1,5 mL e 200 µL de tampão AE foram adicionados a coluna. Em seguida, o tubo foi incubado à temperatura ambiente por 1 min e depois centrifugado a 27.000 g por 1 min. Por fim, o conteúdo do tubo foi alíquotado em 100 µL por tubo.

Posteriormente, a presença do material genético foi verificada através da técnica de eletroforese em gel de agarose 0,8%, utilizando tampão TBE 1,0 X (Tris 90 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 2,5 mM, pH 8,3). Foram acrescidos 3 µL de brometo de etídio no preparo do gel e misturados 2 µL de tampão de corrida (*loading buffer*) a 5 µL de DNA, que posteriormente foram colocados nos poços. Foi utilizado o marcador de peso molecular de 100 bp DNA Ladder (LGC Biotecnologia). O gel foi submetido à eletroforese sob corrente inicial de 60 V por 20 min, seguido de 90 V por 70 min. Depois da corrida, o gel foi visualizado e fotografado sob luz ultravioleta.

3.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Após a extração do ácido desoxirribonucleico genômico foram realizadas reações de PCR utilizando oligonucleotídeos (*primers*) específicos para amplificar o gene *rpoB* (GUNDI et al, 2009). As oxacilinases *bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-24}*, *bla_{OXA-51}*, *bla_{OXA-58}* e *bla_{OXA-143}* (WOODFORD et al, 2006, HIGGINS; LEHMANN; SEIFERT, 2010, HIGGINS et al, 2013), a sequência de inserção *ISAbal* (MUGNIER; POIREL; NORDMANN, 2009) e o gene

qacEΔ1 (KÜCKEN; FEUCHT; KAULFERS, 2000, ROMÃO et al, 2011) estão ilustrados na **Tabela 2**. O aparelho utilizado para a realização das reações foi o termociclador *DNA PTC-200-Peltier Thermal Cycler* (MJ Research, Massachusetts, EUA). Foi utilizado como controle positivo dos genes estudados o DNA genômico de cepas de *A. baumannii* do acervo interno do Setor de Saneantes (*bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-51}*, *ISAbal* e *qacEΔ*) e da coleção de Culturas de Bactérias de Origem Hospitalar (CCBH) do Instituto Oswaldo Cruz (*bla_{OXA-24}*, *bla_{OXA-58}* e *bla_{OXA-143}*).

A reação de amplificação do gene *rpoB* foi realizada em um volume final de 25 µL, contendo 3 µL de DNA adicionados de 2,5 µL de tampão Taq DNA polimerase (10X), 0,75 µL de cloreto de magnésio (1,5 mM), 0,5 µL de dNTP (0,2 mM), 0,8 µL de oligonucleotídeos (0,2 µM), 0,2 µL de Taq DNA polimerase (1U) e água MILLI-Q estéril para completar o volume final da reação. A amplificação foi realizada sob as seguintes condições de ciclagem: pré-desnaturação a 94°C por 2 minutos; 94°C por 30 segundos, temperatura de anelamento a 52°C durante 30 segundos, 72°C por 60 segundos (35 vezes a partir da segunda etapa) e uma alongação final a 72°C por 7 minutos. Os produtos da PCR foram mantidos a 4°C até sua utilização (GUNDI et al, 2009).

A amplificação das oxacilinasas *bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-24}*, *bla_{OXA-51}*, *bla_{OXA-58}* e *bla_{OXA-143}* ocorreu de forma simultânea, por meio da técnica de Multiplex-PCR, utilizando todos os pares de iniciadores específicos de cada gene na mesma reação, de acordo com a metodologia descrita por Woodford et al (2006), com pequenas modificações. A reação foi realizada em volume final de 25 µL, contendo 3 µL de DNA, 2,5 µL de tampão Taq DNA polimerase (10X), 1,5 µL de MgCl₂ (1,5 mM), 0,5 µL de cada dNTP (0,2 mM), 0,25 de cada *primer* (0,2 mM), 0,2 µL de Taq DNA polimerase (5 U/µL) e água Milli-Q estéril para completar o volume final da reação. As reações foram realizadas nas seguintes condições: pré-desnaturação a 94°C por 5 min, seguido por 30 ciclos a 94°C por 25 segundos, 52°C por 40 segundos, 72°C por 50 segundos e 72°C por 6 min.

A amplificação da sequência de inserção *ISAbal* foi realizada em um volume final de 25 µL. As reações individuais foram compostas de 1 µL do DNA adicionados de 2,5 µL de tampão Taq DNA polimerase (10X), 0,75 µL de MgCl₂ (3 mM), 0,5 µL de cada dNTP (0,2 mM), 0,4 µL de cada *primer* (0,2 mM), 0,2 µL de Taq DNA polimerase (5 U/µL) e água Milli-Q estéril para completar o volume final da reação. As reações foram realizadas nas seguintes condições: pré-desnaturação a 94°C por 5 min, seguido por 30 ciclos a 94°C por 1 min, 50°C por 1 min, 72°C por 1 min e 72°C por 5 min.

A reação de amplificação do gene *qacEAI* foi realizada em um volume final de 25 µL contendo 5 µL de DNA adicionados de tampão Taq DNA polimerase (1x), cloreto de magnésio (1,5 mM), dNTP (0,2 mM), oligonucleotídeos (200 nM), Taq DNA polimerase (2,5U/ µL) e água MILLI-Q estéril para completar o volume final da reação. As condições para amplificação foram: 94°C por 3 minutos; 94°C por 30 segundos, temperatura de anelamento a 57°C durante 1 minuto e 30 segundos, 72°C por 60 segundos (30 vezes a partir da segunda etapa), uma elongação final a 72°C por 10 minutos e temperatura final de 4°C (KÜCKEN; FEUCHT; KAULFERS, 2000, ROMÃO et al, 2011).

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1 % em tampão TBE 0,4 X. Foram adicionados 3 µL de brometo de etídio (0,5 mg/mL) no preparo do gel. Foram utilizados 2 µL de tampão de corrida (*loading buffer*) misturados a 5 µL do produto da PCR. Foi utilizado o marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Invitrogen). O gel foi submetido à eletroforese sob corrente inicial a 60 V por 20 min, seguido de 90 V por 40 min. Depois da corrida, o gel foi visualizado e fotografado sob luz ultravioleta em sistema de documentação de géis (*ImageQuant300*).

3.6 SEQUENCIAMENTO GENÉTICO

3.6.1 Purificação do produto da PCR

Os produtos da PCR foram purificados através da coluna de purificação do *Purelink PCR purification kit* (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante, descritas a seguir. Inicialmente foram adicionados 80 µL do reagente B₂ no microtubo contendo 20 µL de produto da PCR e o conteúdo foi homogeneizado. Em seguida, todo conteúdo foi transferido para a coluna *Purelink Spin Column* contendo o tubo coletor, que foi centrifugada a 43.000 g por 1 min e o sobrenadante descartado. Posteriormente, a coluna foi reinsertada no tubo coletor, 325 µL do reagente W₁ foram adicionados e a coluna foi centrifugada a 72.000 g por 1 min, sendo o sobrenadante descartado. Em seguida, a coluna foi recolocada no mesmo tubo coletor e centrifugada a 72.000 g por 3 min. Posteriormente, a coluna foi colocada no tubo de eluição e 25 µL de tampão de eluição foram adicionados no centro da coluna, com

posterior incubação à temperatura ambiente por 1 min. Por fim, a coluna foi centrifugada a 72.000 g por 2 min. O DNA purificado foi estocado em *freezer* na temperatura de -20°C.

Tabela 2. Iniciadores utilizados nas reações de PCR

| Região alvo | Sequência do iniciador (5'→3') | Tamanho do fragmento (pb) ¹ | Referência |
|------------------------------|--|--|--|
| <i>rpoB</i> | F-TAY CGY AAA GAY TTG AAA GAA G R-CMA CAC CYT TGT MCC RTGA | 350-450 | GUNDI et al., 2009 |
| <i>bla_{OXA-23}</i> | F-GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA R-ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT | 501 | WOODFORD et al, 2006 |
| <i>bla_{OXA-24}</i> | R-GGT TAG TTG GCC CCC TTA AA F-AGT TGA GCG AAA AGG GGA TT | 249 | WOODFORD et al, 2006 |
| <i>bla_{OXA-51}</i> | R-TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG F-TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG | 353 | WOODFORD et al, 2006 |
| <i>bla_{OXA-58}</i> | F-AAG TAT TGG GGC TTG TGC TG R-CCC CTC TGC GCT CTA CAT AC | 599 | WOODFORD et al, 2006 |
| <i>bla_{OXA-143}</i> | F-TGG CAC TTT CAG CAG TTC CT R-TAA TCC TGA GGG GGC CAA CC | ± 150 | HIGGINS; LEHMANN; SEIFERT, 2010 |
| <i>ISAbal</i> | F-ATG CAG CGC TTC TTT GCA GG R-AAT GAT TGG TGA CAA TGA AG | 390 | MUGNIER et al, 2009 |
| <i>qacEAl</i> | F- CCC GAA TTC ATG AAA GGC TGG CTT R- TAT AAG CTT TCA CCA TGG CGT CGG | 400 | KÜCKEN; FEUCHT; KAULFERS, 2000 <i>apud</i> ROMÃO et al, 2011 |

¹pb: Pares de Bases

3.6.2 Determinação das sequências nucleotídicas

Os produtos purificados foram sequenciados no sequenciador *ABI Prism 3100 genetic analyzer* (Applied Biosystems). O sequenciamento foi realizado pelo método de terminação com dideoxinucleotídeos utilizando o *Big Dye terminator v.3.1 Cycle sequencing kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA). As análises e comparações das sequências foram realizadas com o auxílio dos aplicativos BLAST (*National Center for Biotechnology Information*;

www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) e Bionumerics versão 4.0 (Applied Maths). Todo o sequenciamento foi realizado na Plataforma de Sequenciamento do Instituto Oswaldo Cruz.

3.7 ELETROFORESE EM GEL DE CAMPO PULSADO (PFGE)

Esta técnica foi realizada de acordo com o protocolo *Pulsenet* (NATIONAL CENTER FOR INFECTIOUS DISEASES, 2004), com algumas modificações, utilizando a enzima de restrição *ApaI*. O DNA cromossômico foi preparado pela técnica de uso *in situ*, em blocos de agarose (1% agarose Seaken Gold) com 1% dodecil sulfato de sódio (SDS). Em resumo, uma alíquota do crescimento bacteriano em fase exponencial foi suspensa em, aproximadamente, 2 mL de tampão para suspensão celular BSC (100 mM Tris: 100mM EDTA, pH 8,0) para a obtenção da turvação correspondente ao grau 3 da escala de McFarland. Aos 500 µL da suspensão de células foi adicionado volume igual de agarose *low melting* a 1% (Seaken Gold Agarose), na temperatura de 50°C e 0,5 µL de proteinase K (20 ml/ml) (Sigma). A mistura foi homogeneizada e distribuída em moldes. Os blocos foram então transferidos para tubos, contendo 2 mL de solução de lise (TRIS-HCl 50 mM:EDTA 50 mM, pH 8,0 + sarcosil a 1%) mais 0,5 µL de proteinase K (20 ml/ml) e incubados por 2 h a 50°C. Em seguida, o tampão de lise foi retirado e os blocos lavados por 3 vezes com 10 mL de água Milli-Q por 15 min a 50°C e 1 vez com tampão TE nas mesmas condições. Os blocos foram então incubados com 10 U da enzima de restrição *ApaI* (Amersham) durante 2 h a 30°C. Os fragmentos de restrição foram separados em gel de agarose a 1% preparado em tampão TE através da eletroforese de campo pulsado, usando o aparelho CHEF-DR III (Bio-Rad, Richmond, USA). Foram utilizadas as seguintes condições para a eletroforese: tempo de pulso crescente de 0,5 a 15 segundos, por 18 h a 6 V/cm, na temperatura de 14°C, com ângulo de 120°. Após a corrida os geis foram corados com brometo de etídio (10 mg/mL), observados e fotografados no aparelho ImageQuant 300. A análise dos genótipos foi realizada através de inspeção visual dos geis de agarose com base nos critérios estabelecidos por Tenover et al (1995). Os resultados obtidos foram analisados através de dendrogramas confeccionados a partir da análise da foto do gel no *software* Bionumerics versão 4.0. (AppliedMaths, Kortrijk, Belgium).

3.8 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DO DESINFETANTE HOSPITALAR FRENTE *A. baumannii*

O desinfetante hospitalar avaliado no estudo possui como componente ativo o monopersulfato de potássio, sendo sua concentração de uso em solução de 1 % e sua utilização destinada a pisos, bancadas, estruturas metálicas, biombos, pias e superfícies em geral.

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do desinfetante estudado foi realizada de acordo com Al-Masaudi et al (1991), com modificações. Após o crescimento dos isolados de *A. baumannii* em caldo TSB por 24 h a 37°C com agitação, os inóculos foram padronizados de modo a se obter uma concentração final de células de cerca de 2×10^5 UFC/mL. Foram testadas as concentrações do desinfetante entre 10 a 2.000 ppm. O ensaio foi realizado em triplicata.

Utilizando uma placa de microtitulação de ELISA (Falcon[®]), 198 µl do desinfetante nas diferentes concentrações foram aliquotados em todos os poços da microplaca, onde cada coluna apresentava uma concentração diferente. Em seguida, 2 µL do inóculo padronizado foram inoculados, de forma que cada isolado ocupava uma linha diferente da microplaca. As placas foram então incubadas a 37°C e a leitura realizada após 24, 48 e 72 h de incubação. A CIM foi àquela correspondente a menor concentração do desinfetante que não forneceu crescimento visível (turvação) no meio TSB. A cepa *A. baumannii* ATCC n° 19606 foi utilizada como controle do teste e as colunas 10, 11 e 12 da microplaca foram utilizadas como controle de esterilidade do meio, controle de esterilidade do desinfetante e viabilidade do meio, respectivamente.

3.9 AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DOS ISOLADOS DE *A. baumannii* AO DESINFETANTE HOSPITALAR

Foi realizado conforme o Método da Diluição de Uso adotado para a avaliação da atividade bactericida de desinfetantes na forma líquida, segundo estabelecido pela *Association of Official Analytical Chemists* – AOAC (TOMASINO, 2012) e o POP INCQS n°

65.3210.007 (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2013), com pequenas modificações.

Primeiramente foi avaliada a qualidade do produto desinfetante frente a cepas de referência preconizadas pelo método [*Staphylococcus aureus* INCQS n° 00039 (ATCC n° 6538), *Salmonella enterica* INCQS n° 00028 (ATCC n° 10708) e *P. aeruginosa* INCQS n° 00025 (ATCC n.º 15442)]. Depois dessa avaliação inicial, o mesmo método foi utilizado para avaliação da susceptibilidade de isolados de *A. baumannii* selecionados através de critérios que procuraram estabelecer isolados representativos da coleção no que diz respeito a período e local de isolamento, diversidade genética e ocorrência ou não de genes de interesse.

Para tanto, 10 µL das culturas estoque foram adicionadas em 10 mL de caldo sintético e os tubos incubados por 24 h a 37°C, correspondendo ao 1° repique. Posteriormente, um repique consecutivo foi realizado em 10 mL de caldo sintético e incubado nas mesmas condições. Um 3° repique consecutivo foi inoculado em 8 tubos contendo 10 mL de caldo sintético, que foram incubados por 48 h a 37°C. Essas culturas foram utilizadas para contaminar os cilindros de aço inoxidável de modo. Os tubos foram agitados e mantidos em repouso por 10 min e posteriormente foi feito um *pool* dos tubos contendo o crescimento em caldo em um erlenmeyer, e 24 mL foram retirados e colocados em tubos contendo 24 cilindros cada, respeitando a proporção de 1 mL de caldo por cilindro. Os cilindros ficaram em contato com as culturas por 15 min, mantidos à temperatura ambiente (**Figura 1**).

Após o tempo de contato, os cilindros foram dispostos verticalmente em placas de Petri forradas com duas folhas de papel de filtro e incubados a 37°C, durante 40 min. Cada um dos cilindros foi transferido em intervalos constantes de 30 seg para os respectivos tubos contendo 10 mL de desinfetante, durante 10 min de exposição, à temperatura de 20°C. Passado esse tempo de contato, os cilindros foram transferidos para tubos contendo 10 mL de caldo nutriente com neutralizante do princípio ativo do desinfetante (tiosulfato de sódio 1 %), em intervalos constantes de 30 seg entre cada tubo. Após 40 min de neutralização no tubo com caldo nutriente (subcultura), cada cilindro foi transferido para outra série de tubos com o mesmo meio de cultura (re-subcultura). Os tubos de subcultura e re-subcultura foram incubados a 37°C, durante 48 h (**Figura 2**).

Esse procedimento foi realizado utilizando-se 60 cilindros de aço inoxidável para cada micro-organismo testado. Para a leitura, foi observada a presença ou ausência de crescimento bacteriano visualmente nos tubos. Caso o micro-organismo apresente crescimento em pelo menos dois cilindros, esse foi considerado ter perfil de susceptibilidade reduzida.

Foram realizados os controles do ensaio, viabilidade e esterilidade do meio de cultura, esterilidade dos lotes de pipetas, esterilidade dos cilindros carreadores de aço inox e a contagem das células viáveis recuperadas dos cilindros de aço inox.

A contagem de unidades formadoras de colônias (UFC)/cilindro de aço inox foi realizada a partir de um cilindro contaminado de cada placa de Petri após o tempo de secagem, sendo esse cilindro submetido a sonicação em 10 mL de caldo Lethen por um min e agitação por um minuto. Em seguida foram realizadas diluições sucessivas de 1 mL do caldo Lethen em 9 mL de tampão fosfato. Alíquotas de 0,1 mL dessas diluições foram plaqueadas por *spread plate* em agar nutriente em duplicata e incubadas a 37° C por 48 h. A contagem das colônias foi realizada apenas nas placas que obtiverem número de colônias de 0 a 300.

Figura 1. Esquema de contaminação dos cilindros de aço inoxidável (carreadores) a partir de culturas estoque de *S. aureus* INCQS n.º 00039 - ATCC n.º 6538, *S. enterica* INCQS n.º 00028 - ATCC n.º 10708 e *P. aeruginosa* INCQS n.º 00025 - ATCC n.º 15442.

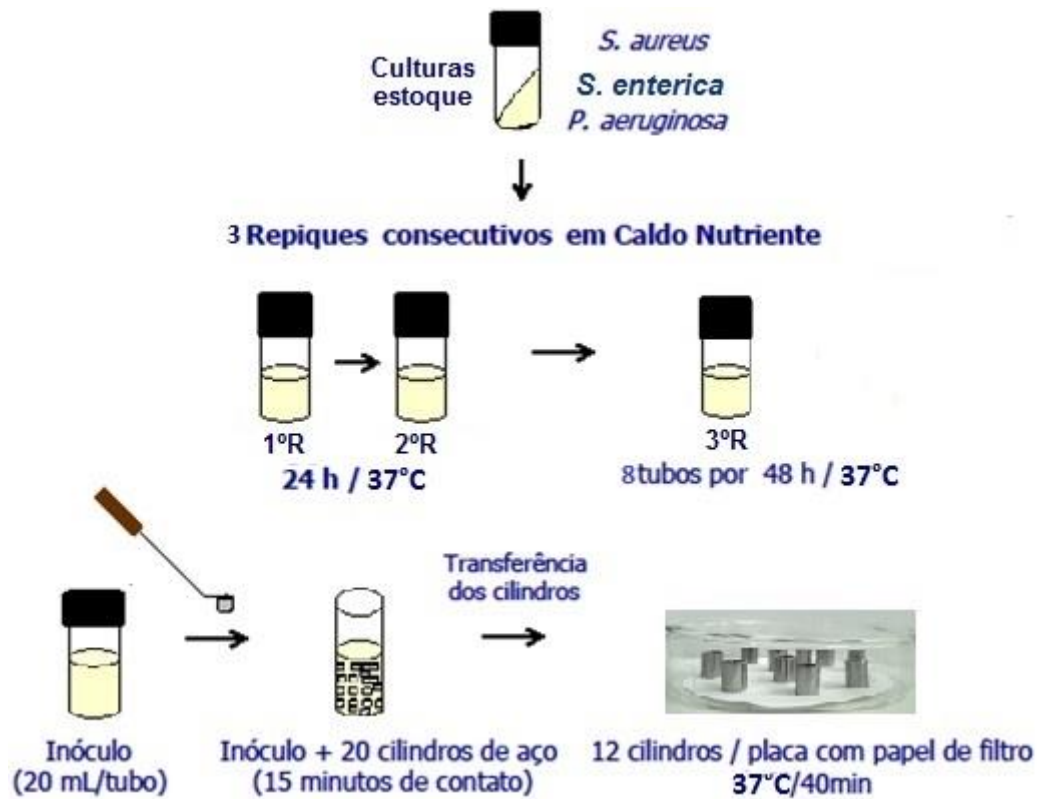
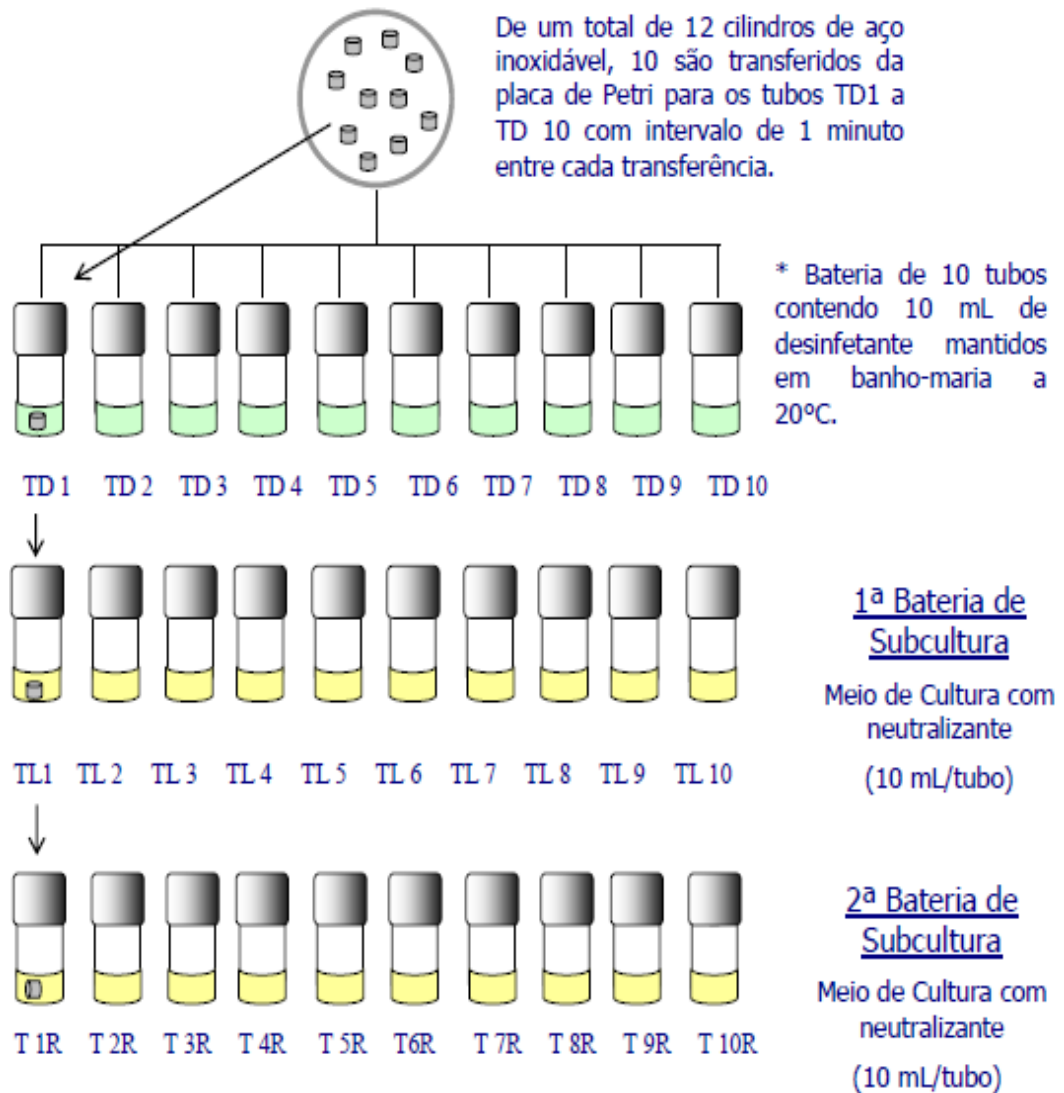


Figura 2. Esquema do Método da Diluição de Uso, segundo estabelecido pela *Association of Official Analytical Chemists – AOAC*.



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

3.10 ANÁLISE DA SUSCEPTIBILIDADE DE *A. baumannii* À DESSECAÇÃO

Foi realizada a partir de uma adaptação dos procedimentos do Método de Diluição de Uso para recuperação e contagem de células viáveis dos cilindros de aço inox. Como controle do ensaio foi utilizada a cepa de referência *A. baumannii* ATCC nº 19606 (WENDT et al, 1997, TOMASINO, 2012, PEREIRA, 2013).

A partir de culturas estoque, 10 µL foram inoculados em 10 mL de caldo sintético e o tubo incubado por 24 h a 37°C, correspondendo ao 1º repique. Um repique consecutivo foi realizado em 10 mL de caldo sintético e incubado nas mesmas condições. Um 3º repique foi realizado em número suficiente de tubos contendo 10 mL de caldo sintético e incubados por 48 h a 37°C. Essa cultura foi utilizada para contaminar os cilindros de aço inoxidável durante 15 min, mantidos à temperatura ambiente.

Após o tempo de contato, os cilindros foram retirados dos tubos e dispostos em placas de Petri forradas com 2 folhas de papel de filtro e incubados a 37°C, durante 40 min, para que ocorresse a adsorção das células à superfície de aço. Posteriormente as placas de Petri foram acondicionadas à temperatura ambiente por até 40 dias.

A recuperação das células viáveis foi realizada a partir de 3 cilindros contaminados de cada placa de Petri após tempos específicos de acondicionamento de 1, 2, 5, 10, 15, 20, 30 e 40 dias.

As células foram recuperadas dos cilindros através de sonicação em 10 mL de caldo TSB e agitação por 1 min em agitador. Em seguida foram realizadas diluições sucessivas de 1 mL do caldo TSB em 9 mL de tampão fosfato. Alíquotas de 0,1 mL dessas diluições foram plaqueadas por *spread plate* em TSA em duplicata e incubadas junto com o caldo TSB contendo os cilindros a 37°C por 24-48 h.

Foi realizada a contagem das colônias das placas que obtiveram entre 1 e 300 colônias e também foi observada a presença ou ausência de crescimento bacteriano nos tubos contendo os cilindros contaminados e secos. Foram realizados também os controles do ensaio, viabilidade e esterilidade do meio de cultura e esterilidade dos cilindros carreadores de aço inox.

3.11 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, através da Plataforma Brasil, sendo aprovado segundo registro 34239614.5.0000.5248.

4 RESULTADOS

4.1 ISOLADOS BACTERIANOS

4.1.1 Isolados clínicos

Todos os 27 isolados clínicos pertencentes ao surto ocorrido em 2011 foram confirmados como *A. baumannii*, além de 15 isolados obtidos de pacientes no período de 2014 a 2015, no mesmo hospital.

4.1.2 Isolados ambientais

Foram obtidos 18 isolados ambientais de *A. baumannii* da Unidade de Tratamento Intensivo (UTI) do hospital estudado, sendo 13 (72%) provenientes de cabeceiras de leito, quatro de mesas de cabeceira (22%) e um da grade do leito (6%). Nas seguintes superfícies/objetos não foi encontrado o micro-organismo envolvido nesse estudo: bancada central do setor, estetoscópios, pias e maçanetas.

4.2 IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA

Através da coloração de Gram e dos testes bioquímicos, todos os isolados apresentaram as seguintes características: cocobacilos Gram negativos, citocromo oxidase negativos, oxidativos de glicose em meio de Hugh-Leifson, Citrato (Simmons) positivos, capazes de crescer a 42°C, imóveis e Indol negativos. Além disso, através da técnica de PCR, o gene *bla_{OXA-51}* se mostrou presente em todos os isolados.

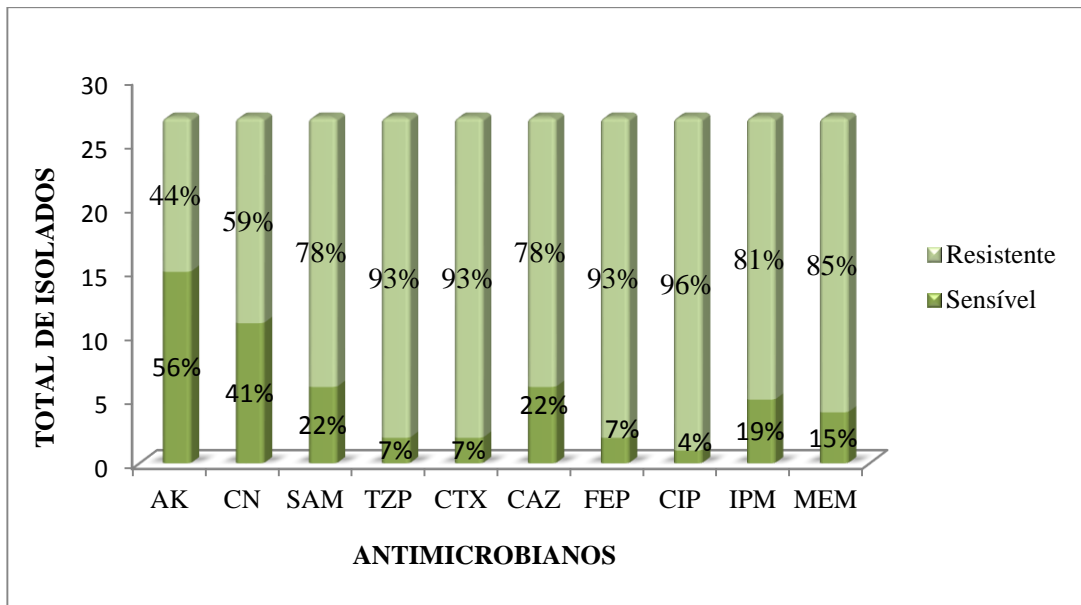
A confirmação da identificação dos isolados clínicos foi feita através do sequenciamento do gene *rpoB* e análise por comparação com as sequências depositadas no GenBank, utilizando-se a ferramenta BLAST, onde todos os isolados apresentaram um nível de similaridade $\geq 98\%$. Já a identificação dos isolados ambientais foi confirmada através de MALDI-TOF MS, utilizando o valor de identificação $\geq 75\%$.

4.3 AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

4.3.1 Técnica de disco difusão

A avaliação da susceptibilidade aos antibióticos revelou que os isolados do surto de 2011 apresentaram elevados percentuais de resistência para todos os antimicrobianos testados, sendo superiores a 78% para oito dos dez antimicrobianos testados. O maior percentual de resistência encontrado foi ao antimicrobiano ciprofloxacina (96%), seguido por cefotaxima, cefepime e piperacilina-tazobactam (93%, cada), meropenem e imipenem (85% e 81%, respectivamente), ampicilina/sulbactam e ceftazidima (78%, cada). Amicacina foi o antimicrobiano que apresentou a maior taxa de susceptibilidade (44%), seguido da gentamicina (41%) (**Figura 3**). Além disso, 63% dos isolados apresentaram resistência a 3 ou mais classes testadas, sendo considerados multirresistentes e 33% foram resistentes a todas as classes (**Figura 4**). Na avaliação de cada isolado de *A. baumannii* a todos os antimicrobianos testados foram encontrados 10 diferentes perfis de resistência, que estão ilustrados na **Tabela 3**.

Figura 3. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos pelo método de disco difusão dos isolados clínicos de *A. baumannii* de 2011.



AK, amicacina; CN, gentamicina; SAM, ampicilina/sulbactam; TZP, piperacilina/tazobactam; CTX, cefotaxima; CAZ, ceftazidima; FEP, cefepima; CIP, ciprofloxacina; IPM, imipenem; MEM, meropenem. Todos os isolados clínicos apresentando resultados intermediários foram considerados resistentes.

Figura 4. Perfil de resistência as diferentes classes de antimicrobianos pelo método de disco difusão dos isolados clínicos de *A. baumannii* de 2011.

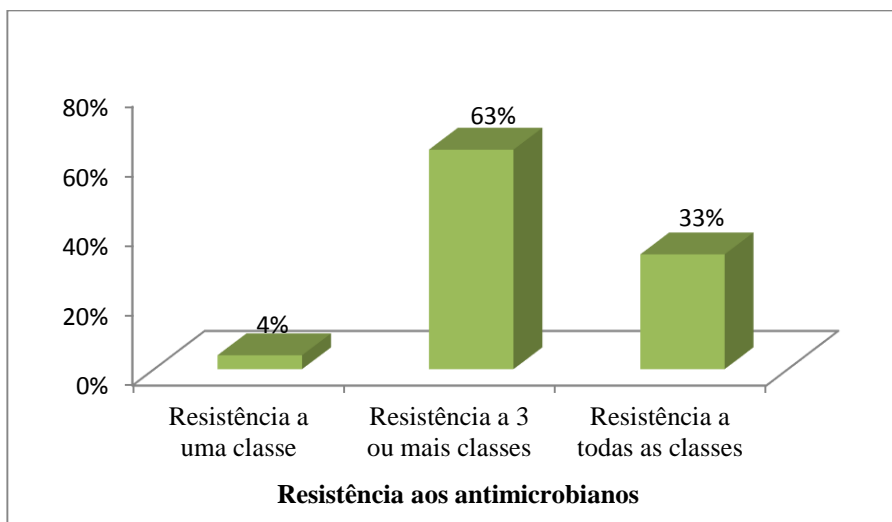


Tabela 3. Perfis de resistência de cada isolado clínico de *A. baumannii* de 2011 a todos os antimicrobianos testados.

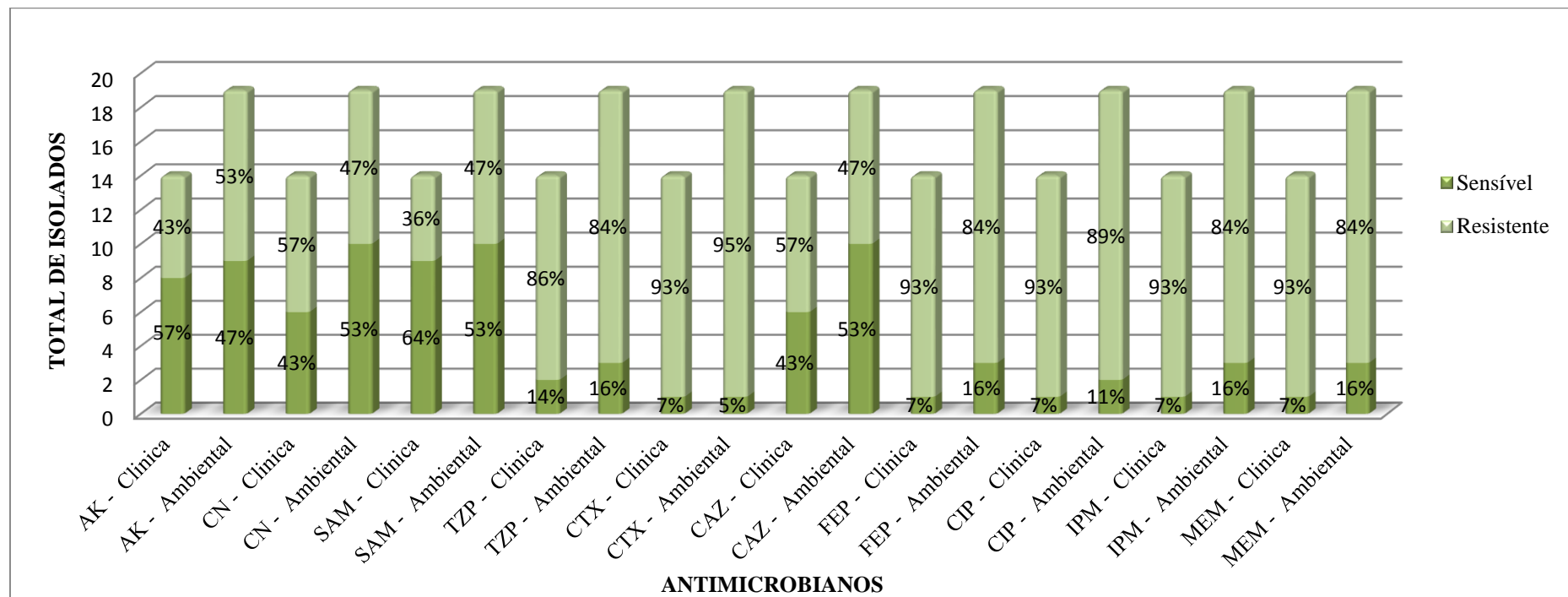
| Isolado | Perfis de resistência aos antimicrobianos |
|---|---|
| 7241, 7277II, 7279, 7365, 7391A, 7391B, 7392, 9472I, 9472II | AK/CN/SAM/TZP/CTX/CAZ/FEP/CIP/IPM/MEM |
| 7021, 7277I | AK/CN/SAM/TZP/CTX/FEP/CIP/IPM/MEM |
| 7457 | AK/CN/TZP/CTX/CAZ/FEP/CIP/IPM/MEM |
| 7024, 7319, 7515I, 7515II, 7532, 9488, 9490, 909510, 933510 | SAM/TZP/CTX/CAZ/FEP/CIP/IPM/MEM |
| 7027 | TZP/CTX/CAZ/FEP/CIP/IPM/MEM |
| 7270 | CN/TZP/CTX/CAZ/FEP/CIP |
| 9480II | CN/TZP/FEP/CIP/MEM |
| 933110 | CN/SAM/TZP/CTX/CIP |
| 7025 | CN/FEP/CIP |
| 7024 | CTX |

AK, amicacina; CN, gentamicina; SAM, ampicilina/sulbactam; TZP, piperacilina/tazobactam; CTX, cefotaxima; CAZ, ceftazidima; FEP, cefepime; CIP, ciprofloxacina; IPM, imipenem; MEM, meropenem. Todos os isolados clínicos apresentando resultados intermediários foram considerados resistentes.

Com relação aos isolados clínicos e ambientais coletados no período de 2014 a 2015, estes apresentaram perfis de susceptibilidade semelhantes aos antimicrobianos testados, sendo encontrados elevados percentuais de resistência a quase todas as classes testadas (**Figura 5**). Os isolados clínicos apresentaram as maiores percentagens de resistência aos antimicrobianos cefotaxima, cefepime, ciprofloxacina, imipenem e meropenem (93%, cada), seguida de piperacilina-tazobactam (86%). A menor percentagem de resistência encontrada foi ao antimicrobiano ampicilina-sulbactam (36%). Em relação aos isolados ambientais, a maior percentagem de resistência encontrada foi a cefotaxima (95%), seguida pela ciprofloxacina (89%), cefepime, imipenem, meropenem e piperacilina-sulbactam (84%, cada). A menor percentagem de resistência encontrada foi aos antimicrobianos ampicilina-sulbactam, gentamicina e ceftazidima (47%, cada).

Avaliando a resistência as diferentes classes de antimicrobianos, 88% dos isolados apresentaram multirresistência e 12% foram resistentes a todas as classes testadas (**Figura 6**). A **Tabela 4** ilustra os 15 perfis de resistência obtidos pela análise de cada isolado clínico e ambiental de *Acinetobacter baumannii* de 2014-2015 a todos os antimicrobianos testados.

Figura 5. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos pelo método de disco difusão dos isolados clínicos e ambientais de *Acinetobacter baumannii* de 2014 e 2015.



AK, ampicilina; CN, gentamicina; SAM, ampicilina/sulbactam; TZP, piperacilina/tazobactam; CTX, cefotaxima; CAZ, ceftazidima; FEP, cefepima; CIP, ciprofloxacina; IPM, imipenem; MEM, meropenem. Todos os isolados clínicos e ambientais apresentando resultados intermediários foram considerados resistentes.

Figura 6. Perfil de resistência as diferentes classes de antimicrobianos pelo método de disco difusão dos isolados clínicos e ambientais de *A. baumannii* de 2014 e 2015.

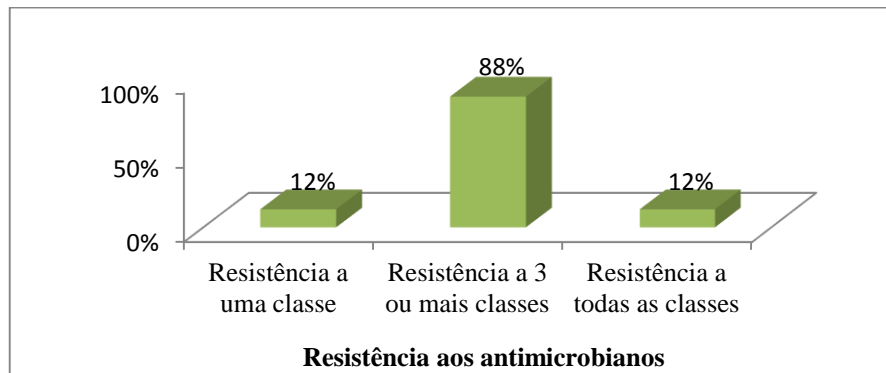


Tabela 4. Perfis de resistência de cada isolado clínico e ambiental de *A. baumannii* de 2014-2015 a todos os antimicrobianos testados.

| Isolado | Perfis de resistência aos antimicrobianos |
|---|---|
| 75 SAN*, 185 SAN**, 188 SAN, 201 SAN, 226 SAN | AK/CN/SAM/TZP/CTX/CAZ/FEP/CIP/IPM/MEM |
| 146 SAN, 147(2) SAN, 167(1) SAN | AK/SAM/TZP/CTX/CAZ/FEP/CIP/IPM/MEM |
| 224 SAN | AK/CN/SAM/TZP/CTX/FEP/CIP/IPM/MEM |
| 66 SAN, 154 SAN, 168(1) SAN, 245 SAN | SAM/TZP/CTX/CAZ/FEP/CIP/IPM/MEM |
| 147(1) SAN, 213(1) SAN, 213(2) SAN, 231 SAN, 256 SAN, 257 SAN | AK/CN/TZP/CTX/FEP/CIP/IPM/MEM |
| 156 SAN | CN/SAM/TZP/CTX/FEP/CIP/IPM/MEM |
| 225 SAN | CN/TZP/CTX/CAZ/FEP/CIP/IPM/MEM |
| 64 SAN | CN/CTX/CAZ/FEP/CIP/IPM/MEM |
| 164 SAN, 165 SAN | CN/TZP/CTX/FEP/CIP/IPM/MEM |
| 167(2) SAN, 253 SAN, 254(2) SAN | TZP/CTX/CAZ/FEP/CIP/IPM/MEM |
| 168(2) SAN, 255 SAN | TZP/CTX/FEP/CIP/IPM/MEM |
| 173 SAN | CTX/CIP |
| 172 SAN | CTX |
| 216 SAN | AK |
| 65 SAN | X |

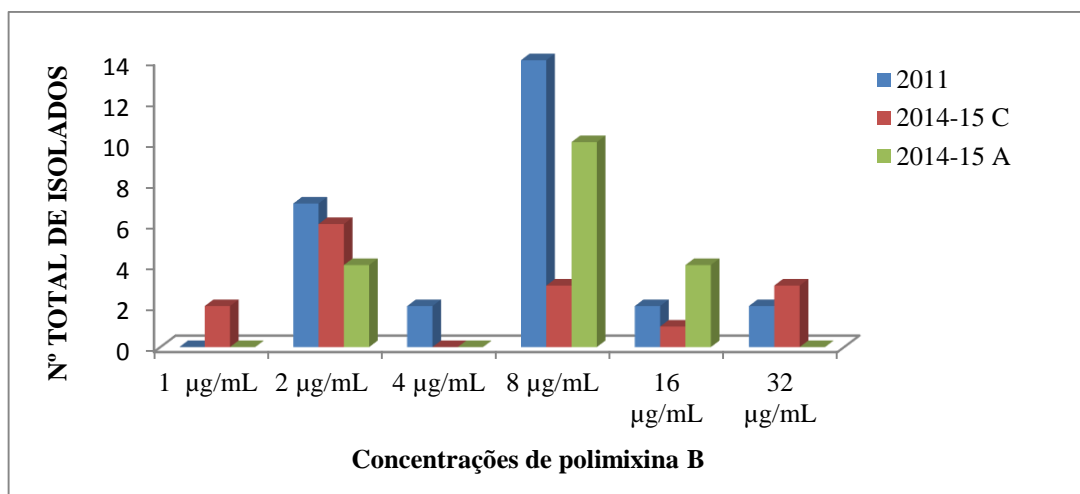
AK, amicacina; CN, gentamicina; SAM, ampicilina/sulbactam; TZP, piperacilina/tazobactam; CTX, cefotaxima; CAZ, ceftazidima; FEP, cefepima; CIP, ciprofloxacina; IPM, imipenem; MEM, meropenem; X, sensibilidade a todos os antimicrobianos. Todos os isolados clínicos e ambientais apresentando resultados intermediários foram considerados resistentes. *Todos os isolados marcados em preto são clínicos; **Todos os isolados marcados em vermelho são ambientais.

4.3.2 Concentração inibitória mínima à polimixina B em isolados clínicos e ambientais de *A. baumannii*

Dentre os 60 isolados testados, 19 (32%) foram sensíveis à polimixina B e 41 (68%) foram resistentes, considerando o critério de resistência de CIM ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$. A **Figura 7** revela as diferentes concentrações inibitórias mínimas apresentadas pelos isolados clínicos de 2011, isolados clínicos de 2014 e 2015 e isolados ambientais do mesmo período. A maioria dos isolados de 2011 apresentaram CIM= 8 $\mu\text{g/mL}$ (52%), assim como os isolados ambientais de 2014-2015 (56%). Já os isolados clínicos do mesmo período apresentaram na sua maioria CIM= 2 $\mu\text{g/mL}$ (40%).

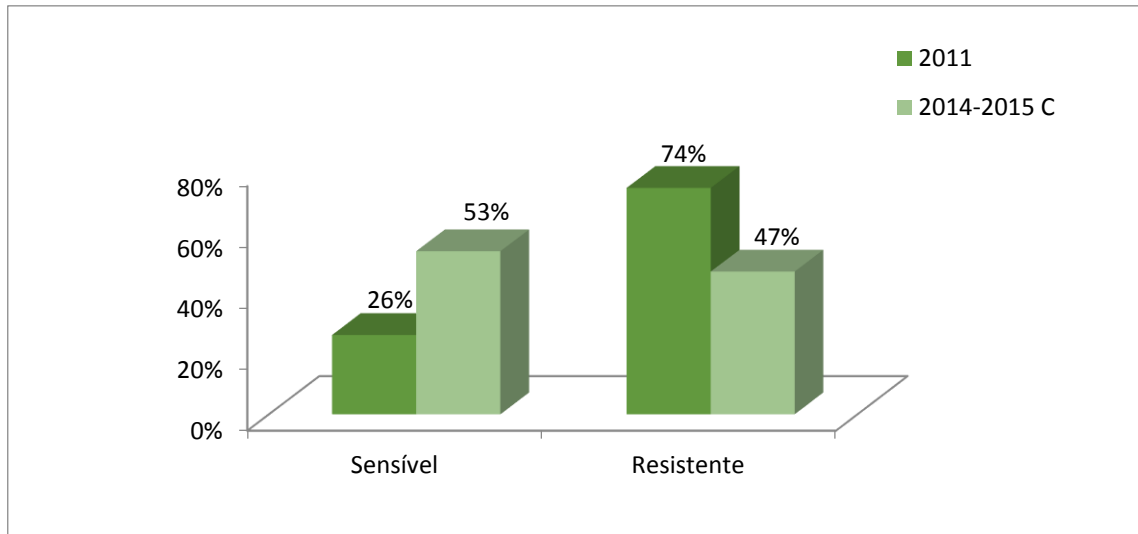
Comparando isolados clínicos do surto de 2011 com os isolados clínicos coletados de 2014 a 2015, observamos que os isolados do surto eram mais resistentes à polimixina B (74%; n=20). Mais da metade dos isolados clínicos coletados de 2014 a 2015 (53%; n=8) apresentou sensibilidade à polimixina B (**Figura 8**). Na comparação de isolados clínicos e ambientais, os ambientais apresentaram maior resistência, já que 78% (n=14) desses apresentaram resistência, contra 64% (n=27) dos isolados clínicos (**Figura 9**).

Figura 7. Diferentes Concentrações Inibitórias Mínimas à Polimixina B apresentadas pelos isolados clínicos de *A. baumannii* do surto de 2011, isolados clínicos e ambientais de 2014 e 2015.



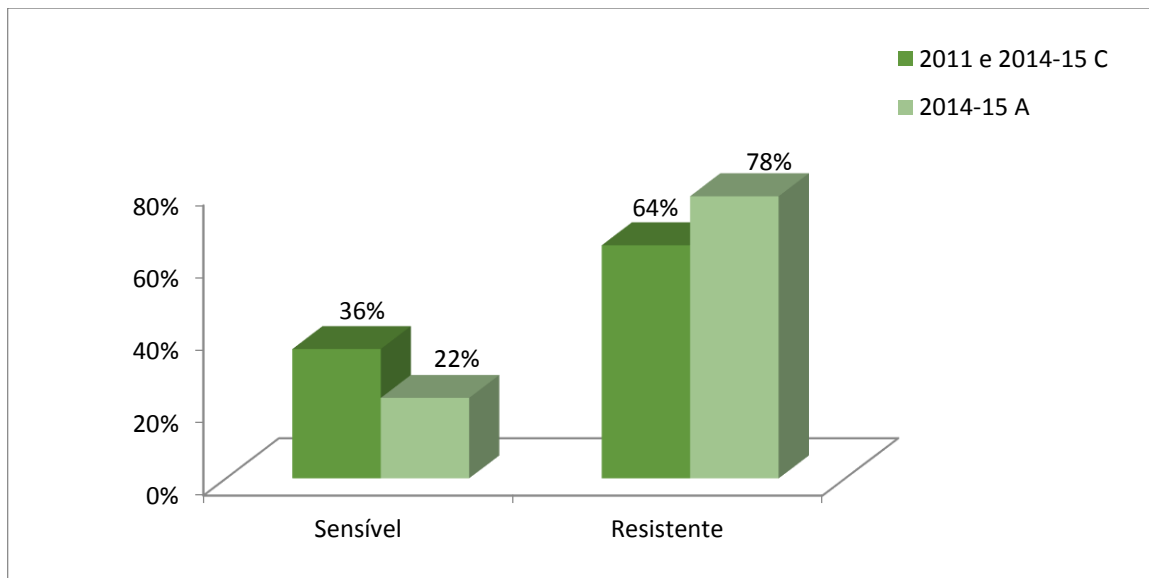
2011: isolados clínicos provenientes do surto de 2011; 2014-15 C: isolados clínicos coletados em 2014 e 2015; 2014-15 A: isolados ambientais coletados em 2014 e 2015.

Figura 8. Diferenças de susceptibilidade à Polimixina B apresentadas entre os isolados clínicos de *A. baumannii* do surto de 2011 e os isolados clínicos de 2014 e 2015.



2011: isolados clínicos provenientes do surto de 2011; 2014-15 C: isolados clínicos coletados em 2014 e 2015.

Figura 9. Diferenças de susceptibilidade à Polimixina B apresentadas entre os isolados clínicos de *A. baumannii* do surto de 2011 e de 2014 e 2015 com os isolados ambientais de 2014 e 2015.



2011: isolados clínicos provenientes do surto de 2011; 2014-15 C: isolados clínicos coletados em 2014 e 2015; 2014-15 A: isolados ambientais coletados em 2014 e 2015.

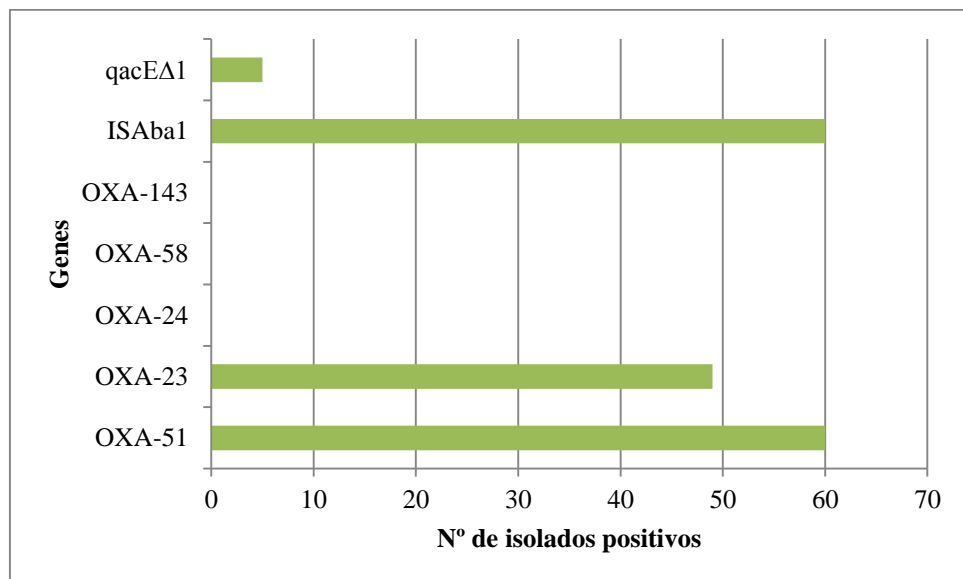
4.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A presença dos genes *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-58} e *bla*_{OXA-143}, codificadores de oxacilinas, e da sequência de inserção *ISAbal*, que está diretamente relacionada ao aumento da expressão desses genes, foi pesquisada.

Entre os 60 isolados clínicos e ambientais estudados, todos apresentaram o gene *bla*_{OXA-51} e 82% (n=49) apresentaram o gene *bla*_{OXA-23}, sendo destes 67% pertencentes aos isolados do surto de 2011 e 94% pertencentes aos isolados clínicos e ambientais de 2014-2015. A presença dos seguintes genes não foi detectada em nenhum isolado: *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-58} e *bla*_{OXA-143}. A presença da sequência de inserção *ISAbal* foi verificada em todos os isolados.

Por fim, o gene *qacEΔ1* foi encontrado em 8% (n= 5) dos isolados, sendo quatro desses clínicos e um ambiental. A **Figura 10** mostra o número de isolados positivos para cada gene.

Figura 10. Presença dos genes estudados em relação aos isolados de *A. baumannii*



4.5 ELETROFORESE EM GEL DE CAMPO PULSADO (PFGE)

O estudo do polimorfismo genético através da técnica de PFGE identificou entre os 60 isolados clínicos e ambientais de *A. baumannii* 16 genótipos (A ao P) com 70% de similaridade entre eles (**Figura 11**). Os genótipos A e B foram os mais prevalentes (25% dos

isolados, n= 15, cada), seguido do genótipo J (13% dos isolados, n= 8), genótipo D (7% dos isolados, n=4) e genótipo L (5% dos isolados, n=3). Os genótipos C, F, G, I e M foram representados por 2 pulsotipos e os demais genótipos (E, K, N, O e P) representados por apenas um pulsotipo. Comparando os genótipos provenientes do surto de 2011 com os coletados no período de 2014 e 2015, foi visto que os genótipos A (41%) e B (19%) prevalentes em 2011 se mantiveram presentes até o momento, sendo o genótipo A (27%) prevalente nos isolados clínicos de 2014 e 2015, seguido do genótipo L (20%), e o genótipo B prevalente nos isolados ambientais desse mesmo período, junto com o genótipo J (39%, cada) (**Figura 12**).

Figura 11. Polimorfismo genético de isolados clínicos e ambientais de *A. baumannii* provenientes de um hospital do Rio de Janeiro e detectados através de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) após digestão do DNA cromossômico com endonuclease de restrição *ApaI*.

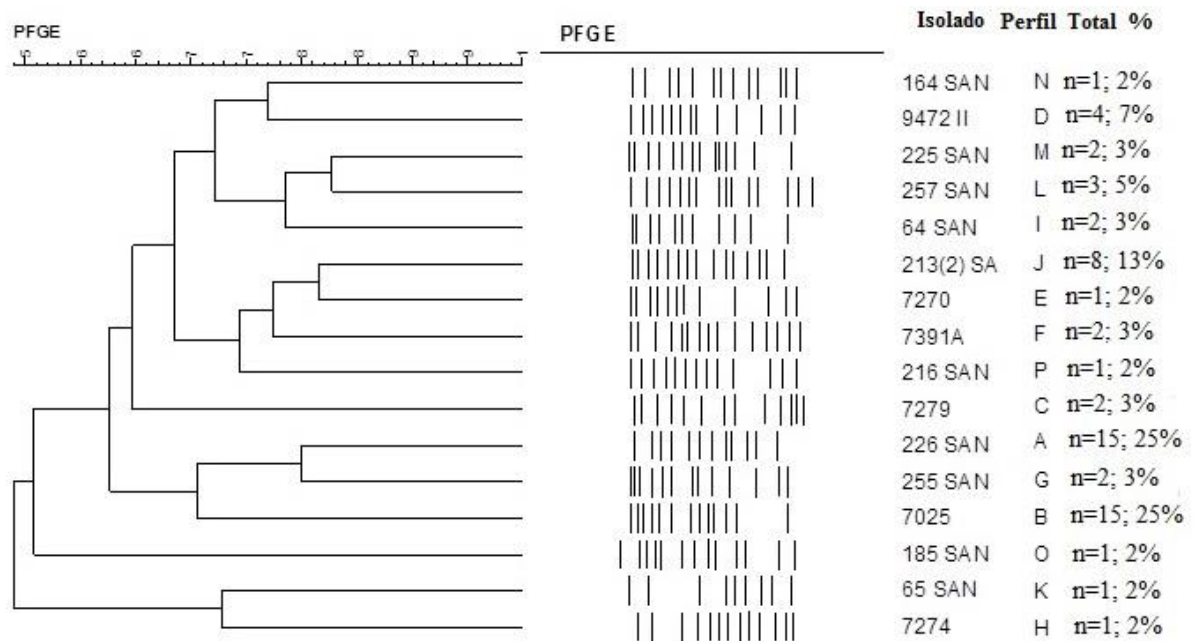
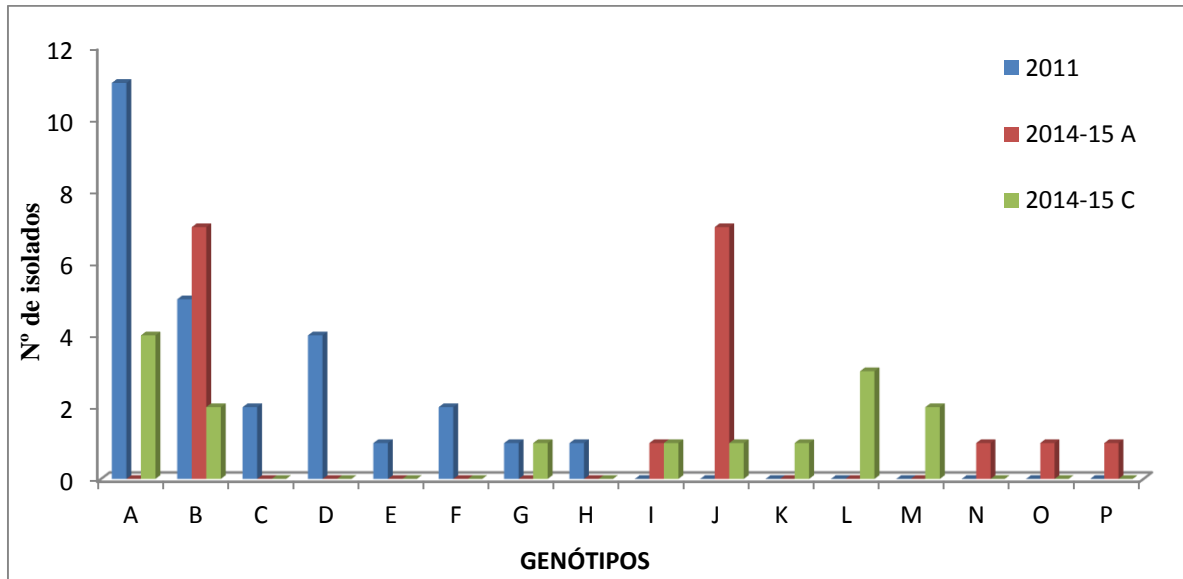


Figura 12. Percentual dos genótipos provenientes do surto de 2011 e dos isolados clínicos e ambientais coletados no período de 2014 e 2015.



2011: isolados clínicos provenientes do surto de 2011; 2014-15 C: isolados clínicos coletados em 2014 e 2015; 2014-15 A: isolados ambientais coletados em 2014 e 2015.

4.6 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DO DESINFETANTE HOSPITALAR

Todos os isolados apresentaram CIM na faixa entre 800 e 2.000 ppm, exceto por um isolado clínico coletado em 2014 que apresentou CIM de 200 ppm. Entre os isolados do surto de 2011 a maioria (56%; n=5) apresentou CIM na faixa entre 1.100 a 1.500 ppm. Além disso, 26% (n= 7) dos isolados coletados naquele período apresentou CIM entre 1.600 a 2.000 ppm e 22% (n= 6) entre 800 e 1.000 ppm (**Figura 13**). Em relação aos isolados coletados entre 2014 e 2015, os clínicos e ambientais obtiveram perfis semelhantes, apresentando em sua maioria CIM entre 1.100 a 1.500 ppm ($\approx 80\%$, cada). Além disso, três isolados clínicos apresentaram CIMs diferentes (200 ppm, 800 ppm e 1.700 ppm) e quatro isolados ambientais (22%) apresentaram CIM na faixa entre 1.600 e 2.000 ppm (**Figura 14**).

Figura 13. Concentração Inibitória Mínima do desinfetante frente aos isolados clínicos obtidos durante o surto de 2011.

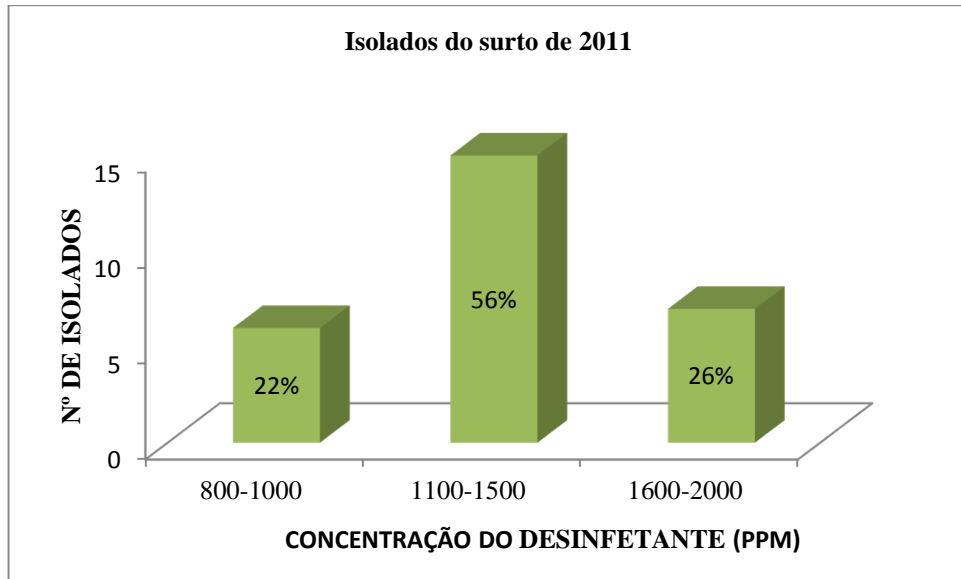
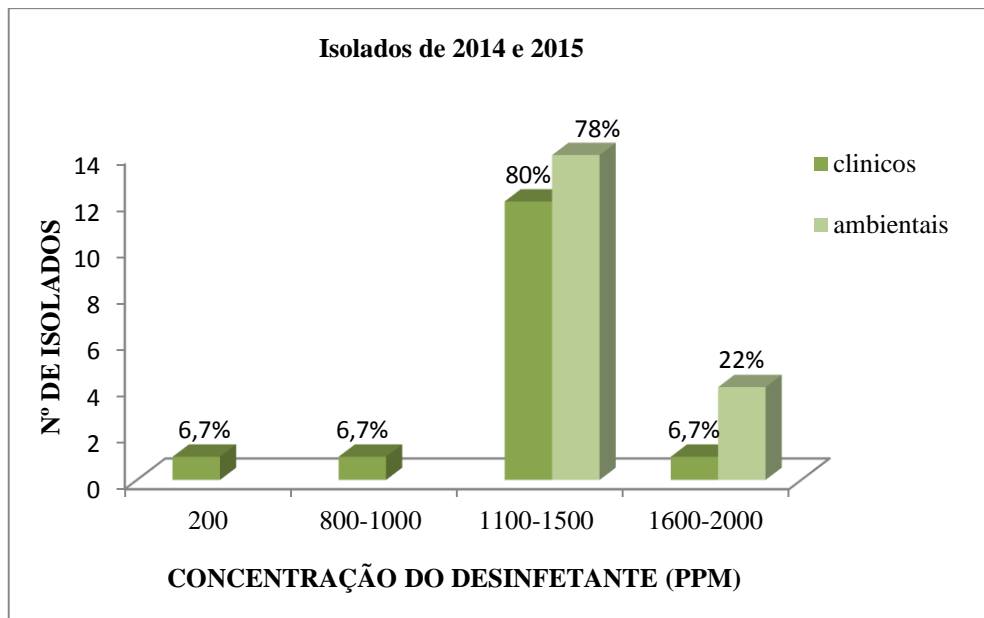


Figura 14. Concentração Inibitória Mínima do desinfetante frente aos isolados clínicos e ambientais obtidos em 2014 e 2015.



4.7 AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DOS ISOLADOS DE *A. baumannii* AO DESINFETANTE HOSPITALAR

Um total de 10 isolados, sendo oito clínicos e dois ambientais foram avaliados. Eles foram selecionados de modo a garantir a maior diversidade da coleção, conforme demonstrado na **Tabela 5**. A contagem média de unidades formadoras de colônias (UFC) por mL nos cilindros carreadores ficou entre 5,6 e 6,4, valor este que está dentro do preconizado (entre 5,0 e 7,0 dependendo do micro-organismo) para que o teste seja considerado satisfatório. Apenas um isolado apresentou susceptibilidade reduzida ao desinfetante estudado, visto que o nº de tubos crescidos (n= 3) ultrapassou o nº preconizado no ensaio (um cilindro).

Tabela 5. Características apresentadas pelos isolados clínicos e ambientais selecionados para a realização do Método da Diluição de Uso e seus respectivos resultados.

| Isolados | Ano | Origem | PFGE | <i>qaceΔ1</i> | CIM | Média log UFC/carreadores | tubos + |
|------------|------|-----------|------|---------------|----------|------------------------------|------------|
| 7277 II | 2011 | Clínica | D | - | 1800 ppm | 5,6 | 0 |
| 7391 B | 2011 | Clínica | F | - | 1800 ppm | 6,1 | 0 |
| 9480 II | 2011 | Clínica | B | - | 900 ppm | 5,8 | 1 |
| 7027 | 2011 | Clínica | B | + | 800 ppm | 5,9 | 3 |
| 9488 | 2011 | Clínica | A | - | 1500 ppm | 6,2 | 0 |
| 64 SAN | 2014 | Clínica | I | + | 1400 ppm | 6,1 | 1 |
| 146 SAN | 2015 | Clínica | B | - | 1100 ppm | 5,8 | 0 |
| 188 SAN | 2015 | Ambiental | I | + | 1700 ppm | 6,0 | 1 |
| 213(2) SAN | 2015 | Ambiental | J | - | 1600 ppm | 6,4 | 0 |
| 225 SAN | 2015 | Clinica | M | + | 1100 ppm | 6,0 | 1 |

PFGE: Eletroforese em gel de campo pulsado; CIM: Concentração inibitória mínima; UFC: Unidades formadoras de colônias; ppm: parte por milhão.

4.8 ANÁLISE DA SUSCEPTIBILIDADE DE *A. baumannii* À DESSECAÇÃO

A análise da susceptibilidade de *A. baumannii* à dessecação foi realizada com os isolados 188 SAN e 225 SAN, que obtiveram MICs de 1.700 e 1.100 ppm, respectivamente e que carregavam o gene *qaceΔ1*. A cepa de referência *A. baumannii* ATCC 19606 foi utilizada como controle do experimento.

As possíveis células viáveis de cada isolado foram recuperadas dos cilindros previamente contaminados após 1, 2, 5, 10, 15, 20, 30 e 40 dias de incubação. Além da contagem das colônias após diluição e plaqueamento (**Tabela 6**), observou-se a presença de crescimento bacteriano nos três tubos contendo os cilindros contaminados de cada isolado e da cepa de referência em todos os dias estabelecidos. A turvação dos tubos revelou que os isolados 188 SAN e 225 SAN foram capazes de sobreviver até o quadragésimo dia de incubação, apesar de não ter sido possível a recuperação das células na contagem através do plaqueamento. A presença de células de *A. baumannii* nos tubos foi confirmada através da coloração de Gram e de provas bioquímicas convencionais. Foi observada a presença de crescimento bacteriano nos cilindros incubados da cepa de referência até o 5º dia. Após este período não houve mais crescimento nos cilindros contaminados.

Tabela 6. Contagens das células viáveis de *A. baumannii* recuperadas até o 40º dia de incubação dos isolados 188 SAN, 225 SAN e cepa ATCC 19606 em UFC/mL.

| Isolado | Contagens UFC/mL | | | | | | | |
|---------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------|--------|
| | Dia 1 | Dia 2 | Dia 5 | Dia 10 | Dia 15 | Dia 20 | Dia 30 | Dia 40 |
| 188 SAN | 6,8x10 ⁶ | 1,1x10 ⁶ | 2,0x10 ³ | 3,3x10 ¹ | 2,7x10 ⁵ | 3,0x10 ⁴ | - | - |
| 225 SAN | 3,7x10 ³ | 9,4x10 ⁴ | 1,0x10 ⁵ | 9,8x10 ³ | 5,4x10 ⁴ | 1,2x10 ⁵ | - | - |
| ATCC | 6,7x10 ² | 2,3x10 ³ | 3,3x10 ² | - | - | - | - | - |

UFC: Unidades formadoras de colônias; ATCC: *American Type Culture Collection*

5 DISCUSSÃO

Durante as três últimas décadas, *A. baumannii* tornou-se um patógeno oportunista de grande importância (MARTINS; HUNYADI; AMARAL, 2013). Isto porque estudos têm verificado sua grande capacidade de adquirir uma diversidade de genes de resistência a antimicrobianos, o que dificulta o seu tratamento, além da capacidade de formarem biofilme e apresentarem resistência à dessecação (LEE et al, 2008, BROSSARD; CAMPAGNARI, 2012, ZARRILLI et al, 2013). Sua capacidade de sobreviver por longos períodos em superfícies abióticas, tais como equipamentos hospitalares, macas e equipamentos de ventilação mecânica (MCCONNELL, ACTIS; PACHON, 2013, FIESTER; ACTIS, 2013) o tornou difícil de ser erradicado do ambiente hospitalar e, por consequência, facilmente transmitido entre pacientes, o que favorece a ocorrência de surtos de infecções (GADDY; ACTIS, 2009, HOWARD et. al., 2012). Por esses motivos, estudos sobre a prevalência desse patógeno, bem como dos fatores que permitem sua permanência nesses ambientes são fundamentais para a evolução das ações de prevenção e para o desenvolvimento de estratégias de controle dessas infecções.

Os isolados clínicos e ambientais de *A. baumannii* avaliados no presente estudo apresentaram altas taxas de resistência à maioria das classes de antimicrobianos testados. De acordo com a classificação definida pelo *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) e *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), o termo MDR é utilizado quando ocorre a não susceptibilidade a pelo um agente de três ou mais classes de antimicrobianos. Utilizando essa definição no presente estudo, 63% (n=17) dos isolados pertencentes ao surto de 2011 foram multirresistentes, além de 88% (n=29) dos isolados obtidos no período de 2014 e 2015, sendo destes 93% (n=14) isolados clínicos e 83% (n=15) isolados ambientais. Além disso, alguns isolados se mostraram resistentes a todas as classes de antimicrobianos testados (aminoglicosídeos, penicilinas associadas a inibidores de β -lactamases, cefalosporinas, fluoroquinolonas, carbapenêmicos e polimixinas). Provenientes do surto de 2011, 33% (n=9) dos isolados foram resistentes a todos os agentes, em relação aos anos de 2014 e 2015, 12% (n=4) dos isolados coletados também a apresentaram essa característica, sendo um isolado clínico e três ambientais.

Esses dados corroboram com outros estudos que apontam que *A. baumannii* se tornou um patógeno multirresistente (MDR), conseqüentemente um grande motivo de preocupação na clínica médica. Um estudo de vigilância realizado por Marra et al (2011), realizado em 16

hospitais brasileiros envolvendo 2.563 pacientes com infecção de corrente sanguínea por diferentes patógenos, entre os anos de 2007 a 2010, apresentou resultados semelhantes. Nesse estudo, os isolados de *Acinetobacter* spp. (4º patógeno mais prevalente) apresentaram perfil de resistência superior a 50% as seguintes classes de antimicrobianos: cefalosporinas, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e carbapenêmicos, com taxas de 56% para imipenem, 56,4% para meropenem, 70% para ceftazidima, 78% para cefepime, 52% para gentamicina, 73% para ciprofloxacina e 76% para piperacilina/tazobactam. Um estudo nacional multicêntrico na Espanha realizado por Fernández-Cuenca et al (2013) relatou um percentual de 94% (n=436) de isolados de *A. baumannii* multirresistentes. Além disso, uma avaliação temporal com isolados de 2000 e 2010 revelou um aumento significativo da resistência aos carbapenêmicos e, em menor proporção, a ceftadizima. Esse estudo difere dos resultados encontrados no presente estudo, onde os percentuais de resistência aos carbapenêmicos se mantiveram semelhantes entre os isolados do surto de 2011 e os coletados em 2014-2015 e o percentual de resistência a ceftazidima diminuiu de 78% para 57% (isolados clínicos) e 47% (isolados ambientais).

O uso indiscriminado e o grande aumento na utilização dos antimicrobianos carbapenêmicos têm levado os isolados de *A. baumannii* a apresentar elevados percentuais de resistência a essas drogas, graças à aquisição de mecanismos de resistência. No presente estudo, as taxas de resistência ao imipenem e ao meropenem foram maiores que 80%, tanto com os isolados de 2011 quanto com os de 2014-2015. Estudos por todo o mundo têm relatado altos percentuais de resistência aos carbapenêmicos. Em um estudo realizado por Higgins et al (2010) com isolados de diferentes continentes (América do Norte e América Latina, Europa, Ásia, África do Sul e Austrália), os autores encontraram um percentual de resistência ao imipenem de 96% (n=492). Em 2014, na Colômbia, Prado et al relataram uma taxa de 72% de resistência ao meropenem. Llaca-Díaz et al (2012) em estudo realizado em um hospital universitário no México mostraram que 65% dos isolados de *A. baumannii* provenientes de pacientes internados em UTIs apresentaram resistência aos carbapenêmicos.

Os antimicrobianos mais ativos contra *A. baumannii* no atual estudo foram a amicacina (56% de sensibilidade) no surto de 2011 e ampicilina-sulbactam nos isolados clínicos e ambientais (64% e 53% de sensibilidade, respectivamente) do período de 2014-2015. O percentual de resistência a ampicilina-sulbactam diminuiu de 78% no surto de 2011 para 36% e 47% dos isolados clínicos e ambientais de 2014-2015, respectivamente. A amicacina continuou sendo um dos agentes mais eficazes em 2014-2015, apresentando sensibilidade em 57% dos isolados clínicos e em 47% dos ambientais. Resultado semelhante

foi encontrado por Fernández-Cuenca et al (2013) em relação a amicacina, onde a percentagem de sensibilidade a esse agente foi de 52%. Esse estudo também revelou que o percentual de resistência à amicacina diminuiu de 65% em 2001 para 49% em 2010. Já o percentual de resistência a ampicilina-sulbactam, diferentemente do presente estudo, aumentou de 53% para 65%. Em Israel, um estudo revelou que o tratamento com ampicilina-sulbactam foi associado com a redução da mortalidade de pacientes com infecção na corrente sanguínea por *A. baumannii* multirresistente (SMOLYAKOV et al, 2003). Segundo Fishbain e Peleg (2010), o sulbactam é o inibidor de b-lactamases que possui a melhor atividade contra *A. baumannii*. Esse estudo também relatou que a amicacina, assim como os outros antimicrobianos aminoglicosídeos, não têm sido mais utilizada como agente único para o tratamento de infecções por *A. baumannii*, e que sua toxicidade é um fator que dificulta a sua utilização. Além disso, diversos relatos têm sido descritos sobre a falsa susceptibilidade dos isolados de *A. baumannii* frente à amicacina quando métodos automatizados são utilizados (AKERS et al, 2010, JUNG et al, 2010).

Apesar de a amicacina ter sido um dos agentes mais ativos contra *A. baumannii* nos dois períodos do presente estudo e da ampicilina-sulbactam ter sido o agente mais eficaz contra os isolados de 2014-2015, vários estudos revelam altas taxas de resistência a essas drogas, tanto no Brasil como em outros países. Nos Estados Unidos, Valentine et al (2008) relataram que 75% dos isolados de *A. baumannii* provenientes de um surto em Los Angeles foram resistentes à amicacina. No Brasil, Cortivo et al (2015) relataram resistência à amicacina e à ampicilina-sulbactam em 80% e 94% dos isolados estudados, respectivamente. Um estudo na Turquia em 2014 revelou que 70% dos isolados clínicos de *A. baumannii* apresentaram resistência à amicacina e 63% à ampicilina-sulbactam (ALTUN et al, 2014).

Com o crescente aumento da resistência aos carbapenêmicos, as polimixinas se tornaram a última opção de tratamento de isolados de *A. baumannii* panresistentes (resistentes a todas as classes antimicrobianas). No entanto, a resistência a esses agentes também tem crescido e sido relatada em vários países como a Austrália, Tailândia, Indonésia, Índia, China, Taiwan, Cingapura, Coreia do Sul e América do Sul (LI et al, 2006, HAWLEY; MURRAY; JORGENSEN, 2008, YAU et al, 2009). No presente estudo, 68% (n=41) de todos os isolados foram resistentes à polimixina B. Um possível motivo para o aparecimento de cepas resistentes à polimixina B é a heterorresistência, que já foi descrita para polimixinas em *A. baumannii* (LI et al, 2006, YAU et al, 2009, RODRIGUEZ et al 2009, CHANG et al, 2012). Heterorresistência é o nome dado ao surgimento de uma subpopulação resistente em uma população de isolados sensíveis à polimixina. Segundo Cai et al (2012), a prévia exposição à

polimixinas contribui para o desenvolvimento de heterorresistência, selecionando isolados com CIMs mais elevadas, o que pode levar a falha terapêutica. Um estudo na Coreia mostrou duas subpopulações de *A. baumannii* que apresentaram percentual de resistência à polimixina B de 38,9% e 72,2% (KO et al, 2007). A heterorresistência as polimixinas tem sido amplamente observada entre isolados clínicos de *A. baumannii* em percentuais elevados, chegando a 90% (LI et al., 2006, BARIN et al., 2013).

Apesar de os mecanismos de resistência de *A. baumannii* à polimixina B ainda não terem sido esclarecidos, acredita-se que mutações no gene *pmrB*, que regula a transcrição da enzima NaxD deacetylase, sejam responsáveis por esse perfil. Essa enzima medeia à modificação do lipídeo A, o alvo da polimixina presente na membrana externa de Gram-negativos, resultando na resistência a essa droga (BECEIRO et al, 2011, LLEWELLYN et al, 2012, CHIN et al, 2015, LIM et al, 2015).

Estudos manifestam uma associação clara entre o uso de polimixina e o aumento da resistência de bactérias Gram-negativas a esse antimicrobiano (MARCHAIM et al, 2011). No entanto, outros estudos epidemiológicos são necessários para correlacionar o aparecimento de *Acinetobacter baumannii* resistente à polimixina B e o uso frequente de polimixinas para o tratamento de infecções por isolados resistentes à colistina, inclusive no Brasil (REIS et al, 2003, SNITKIN et al, 2013). Desde o surgimento da resistência a polimixina B ainda não surgiram outras opções terapêuticas para o tratamento de infecções causadas por isolados de *Acinetobacter* spp. MDR (AL-SWEIH; AL-HUBAIL; ROTIMI, 2011). Por conta disso, medidas de controle de infecção rigorosas devem ser adotadas para evitar o surgimento e a propagação de tais isolados.

A primeira descrição de enzima tipo OXA com potente atividade carbapenemase ocorreu pela descrição de um plasmídeo contendo o gene *bla*_{OXA-23} em 1985. Esse gene pode estar localizado no cromossoma ou em plasmídeos, e também em associação com diferentes estruturas genéticas (MUGNIER et al., 2010). Atualmente, a expressão das enzimas oxacilinas é o principal mecanismo responsável pela resistência de *A. baumannii* aos carbapenêmicos. As oxacilinas OXA-51 são identificadas na maioria dos isolados de *Acinetobacter*, sendo intrínsecas ao gênero *Acinetobacter baumannii*. Por esse motivo, em todos os isolados do presente estudo foi detectada a presença do gene *bla*_{OXA-51}, sendo esse utilizado como um marcador para a identificação da espécie.

O gene *bla*_{OXA-23} tem sido reportado como o principal gene codificador de oxacilinas encontrado em *A. baumannii* (TOUATI et al, 2012, ABBOTT et al, 2013, AL-AGAMY et al, 2014b, CICEK et al, 2013, FOUAD et al, 2013). Essa afirmação encontra-se de acordo com o

encontrado no presente estudo, em que 82% (n=49) de todos os isolados estudados apresentaram esse gene. A alta taxa de resistência aos carbapenêmicos, encontrada no presente estudo (>80%), pode ser justificada pela presença desse gene. Além disso, a diferença no número de isolados positivos encontrados no surto de 2011 (67%; n=18) comparado ao número encontrado nos isolados clínicos e ambientais coletados no período de 2014 e 2015 (94%; n=31) indica que esse gene tem se propagado ao longo dos anos. Estudo realizado por Marra et al (2011) relatou a presença desse gene em 76% dos isolados de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos. Cortivo et al (2015) e Carvalho et al (2009) detectaram a presença de *bla*_{OXA-23} em 87% dos isolados de *A. baumannii* estudados. Outros estudos encontraram a presença desse gene em todos os isolados clínicos de *A. baumannii* estudados (CIESLINSKI et al, 2013, FOUAD et al, 2013, KEMPF et al, 2013).

Diferentemente do gene *bla*_{OXA-23}, a ocorrência dos outros genes codificadores de oxacilinas *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-58} e *bla*_{OXA-143} ainda não está amplamente difundida. O presente estudo não detectou a presença desses genes em nenhum isolado, apesar de diversos estudos já terem relatado a presença desses genes em *A. baumannii*, inclusive no Brasil (LOLANS et al, 2006, TURTON et al, 2006, HIGGINS et al, 2009, FIGUEIREDO et al, 2011, HIGGINS et al, 2013, ÖZCAN et al, 2015). Esse fato reforça a importância da vigilância epidemiológica e das medidas de controle da resistência microbiana, a fim de se evitar que esses e outros genes se difundam entre os isolados de *A. baumannii*, como foi o caso de *bla*_{OXA-23}.

A sequência de inserção *ISAbal*, quando presente adjacente ao gene codificador da enzima, pode atuar como um promotor transcricional para os genes das oxacilinas, levando a uma hiperexpressão desses genes (NORDMANN; POIREL, 2002, TURTON et al, 2006b, RUIZ et al, 2007, DIJKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007). A presença dessa sequência foi detectada em todos os isolados do presente estudo. No entanto, não foi possível estudar a associação dessa sequência com os genes *bla*_{OXA-51} e *bla*_{OXA-23}. Dos 8 isolados sensíveis aos carbapenêmicos encontrados no presente estudo, 5 possuíam apenas o gene *bla*_{OXA-51} e os demais possuíam *bla*_{OXA-51} e *bla*_{OXA-23}. Apesar de *ISAbal* ter sido detectada em todos os isolados, provavelmente nesses isolados não estava sendo expressa, justificando assim o perfil de susceptibilidade desses isolados aos carbapenêmicos.

Estudos em todo mundo tem relatado uma alta prevalência dessa sequência de inserção em *A. baumannii*. Estudo realizado por Hammoudi et al (2015) no Líbano detectou a presença de *ISAbal* em todos os isolados estudados, estando todas as sequências a montante e adjacentes ao gene *bla*_{OXA-23}. Já Martínez e Mattar (2012) detectaram a presença de *bla*_{OXA-51}

associado a *ISAbal* e de *bla_{OXA-23}* associado a *ISAbal* em apenas 25% e 30% dos isolados do estudo, respectivamente. No Reino Unido, Turton et al (2006b) relataram que dos isolados de *A. baumannii* que possuíam o gene *bla_{OXA-51}* como único gene de carbapenemase, apenas os que possuíam a presença de *ISAbal* a montante e adjacente ao gene *bla_{OXA-51}* foram resistentes ao imipenem e ao meropenem, indicando o papel de *ISAbal* como promotor desse gene. Eles também observaram que todos os isolados *bla_{OXA-23}* positivos apresentavam a sequência de inserção *ISAbal* a montante ao gene e que os isolados que possuíam ambos os genes *bla_{OXA-51}* e *bla_{OXA-23}* apresentavam *ISAbal* apenas associada a *bla_{OXA-23}*, sugerindo que não ocorre uma coexpressão dos dois genes. Em um estudo no Egito, Al-Agamy et al (2014a) detectaram a presença de *ISAbal* em todos os isolados estudados. Além disso, eles verificaram a associação dessa sequência de inserção com os genes *bla_{OXA-51}* e *bla_{OXA-23}* em 85% (n=34) e 80% (n=16) dos isolados positivos, respectivamente.

A técnica de PFGE é uma ferramenta utilizada para estabelecer a relação clonal entre isolados bacterianos, permitindo a identificação de surtos de infecção e o monitoramento interinstitucional de patógenos. Em muitas instituições de saúde, infecções endêmicas por *Acinetobacter* MDR demonstram perfis epidemiológicos complexos e coexistência de vários tipos diferentes de clones (NEMEC; DIJKSHOORN; VAN DER REIJDEN, 2004, CORNAGLIA et al, 2007, WEBER et al, 2010). No presente estudo, foram encontrados 16 genótipos diferentes de *A. baumannii*.

Os genótipos A e B prevalentes no surto de 2011 mantiveram-se presentes nos isolados coletados no período de 2014-2015, sendo o genótipo B encontrado nos isolados clínicos e ambientais desse período e o genótipo A encontrado apenas nos isolados clínicos de 2014-2015. Além disso, o outro genótipo prevalente nos isolados ambientais, o genótipo J, só esteve presente em um isolado clínico do mesmo período e em nenhum isolado proveniente do surto de 2011. Outro achado interessante foi que 80% e 71% dos isolados do genótipo A e B, respectivamente, apresentaram susceptibilidade a pelo menos um dos aminoglicosídeos testados. Com relação aos isolados pertencentes ao genótipo J, prevalente nos isolados ambientais junto com o B, 86% foram sensíveis a uma das cefalosporinas testadas.

A permanência do genótipo B ainda no período de 2014-2015, inclusive em isolados ambientais provenientes de uma mesa de cabeceira e de quatro cabeceiras de leito do UTI, sugere que esse clone conseguiu permanecer no ambiente hospitalar ao longo dos anos, e que esses ambientes podem servir como uma fonte de contaminação cruzada. Segundo Weber et al (2010), uma vez que um isolado de um surto se estabelece, ele pode se tornar endêmico dentro da instituição. Além disso, esse genótipo foi encontrado nos dois períodos distintos de

coleta (no intervalo de um mês) em um mesmo leito, reforçando a importância da implementação de medidas eficazes de desinfecção e controle da disseminação de patógenos no ambiente hospitalar. Outro fato observado foi a presença de isolados do genótipo B tanto na mesa de cabeira como na cabeceira de leito de um mesmo box, revelando uma provável contaminação cruzada entre as duas superfícies e a disseminação de *A. baumannii* nesse ambiente.

Os genótipos I e J foram encontrados tanto em isolados clínicos quanto ambientais no período de 2014 e 2015. Os isolados clínicos e ambientais pertencentes ao genótipo J apresentaram perfil multirresistente. O isolado clínico pertencente ao genótipo I apresentou sensibilidade aos antimicrobianos amicacina, ampicilina-sulbactam e piperacilina-tazobactam. Também foi verificada a presença do gene de resistência a desinfetantes *qacEΔ1* nesse isolado. Já o isolado ambiental pertencente a esse genótipo foi resistente a todos os antimicrobianos testados e também apresentou o gene *qacEΔ1*. Além disso, sua capacidade de resistência à dessecação foi verificada e ele se mostrou capaz de sobreviver em condições adversas por até 40 dias. Esses resultados demonstram que um isolado altamente resistente a antimicrobianos possui fatores que podem permitir sua persistência no ambiente hospitalar, sendo capaz de infectar pacientes, visto que também foi encontrado em um isolado clínico.

Os genótipos N, O e P, encontrados apenas em isolados ambientais do período de 2014 e 2015, possuem características distintas. Enquanto o isolado pertencente ao genótipo P foi sensível a todos os antimicrobianos testados, com exceção da amicacina, e o genótipo N apresentou sensibilidade a antimicrobianos de três classes distintas (amicacina, ampicilina-sulbactam e ceftazidima), o isolado do genótipo O se mostrou resistente a todos os agentes testados. A presença de um isolado multirresistente no ambiente hospitalar é preocupante, já que ele pode disseminar seus mecanismos de resistência entre outros genótipos e, caso infecte o paciente, as opções terapêuticas serão limitadas.

Segundo Huang, Datta e Plat (2006) a participação do ambiente hospitalar em IRAS pode ser maior nas UTIs, devido à gravidade e à instabilidade do quadro clínico dos pacientes em cuidados intensivos, somadas a fatores como limpeza, desinfecção, estrutura física, quantidades de equipamentos e de superfícies em determinadas unidades. O trânsito de pessoas (equipe de saúde e visitantes) na unidade, e o conseqüente contato com pacientes, objetos e superfícies conferem a possibilidade de disseminação de clones epidêmicos (COMERT et al 2007, WYBO et al, 2007). Assim, a instrução contínua dos profissionais de saúde e a orientação dos pacientes, familiares e visitantes quanto às medidas de controle de

IRAS constituem um aspecto importante para a prevenção dessas infecções (OLIVEIRA; DAMASCENO, 2010).

Com o objetivo de prevenir a disseminação de micro-organismos patogênicos no ambiente hospitalar, produtos desinfetantes são rotineiramente empregados. Alguns agentes patogênicos comumente encontrados no ambiente hospitalar desenvolveram mecanismos responsáveis pela diminuição da susceptibilidade a esses agentes. No entanto, os mecanismos moleculares de *A. baumannii* que determinam a sensibilidade reduzida a desinfetantes ainda permanecem desconhecidos. Estudos em bactérias Gram-negativas demonstram que as bombas de efluxo possuem importante papel na resistência intrínseca a desinfetantes (RAJAMOHAN; SRINIVASAN; GEBREYES, 2010).

O gene *qacEΔ1*, responsável por codificar a bomba de efluxo SMR, já foi detectado em isolados de *A. baumannii*, tendo sido encontrado em percentagens significativas em diferentes estudos (YIN et al, 2008, HOU et al, 2007, RAJAMOHAN; SRINIVASAN; GEBREYES, 2010). Babaei et al (2015) verificaram a presença desse gene em 73% de isolados clínicos de *A. baumannii* MDR. Esse gene é carregado por integrons de classe 1, junto com o gene de resistência a sulfonamida *sulI* (HOU et al, 2007, PÉRICHON et al, 2008, YIN et al, 2008, MAK et al, 2009, SAULE et al, 2013). No presente estudo, o gene *qacEΔ1* foi encontrado em 8% (n= 5) dos isolados, sendo quatro desses clínicos e um ambiental. Esses isolados pertencem a quatro complexos clonais diferentes, o que indica uma possível propagação desse gene entre os clones. Além do gene *qacEΔ1*, os integrons de classe 1 também são conhecidos por conterem regiões com múltiplos genes de resistência aos antibióticos. A presença de elementos genéticos associados com resistência a antimicrobianos e biocidas em *A. baumannii* sugere que tais elementos possam favorecer sua permanência no ambiente hospitalar e a disseminação de cepas multirresistentes (ÇİÇEK et al, 2013).

Neste estudo, a avaliação da CIM do desinfetante, utilizado no hospital de estudo, revelou que todos os isolados se encontraram na faixa entre 800 e 2.000 ppm, exceto por um isolado clínico coletado em 2014 que apresentou CIM de 200 ppm. Essas altas taxas de CIM encontradas podem estar relacionadas com a presença de integrons classe 1 e justificariam porque esse patógeno é tão difícil de ser erradicado do ambiente hospitalar. Além disso, a capacidade de sobrevivência de *A. baumannii* em superfícies inanimadas por longos períodos de tempo é um importante fator que faz desse patógeno um risco emergente, contaminando facilmente o ambiente hospitalar e acarretando na sua transmissão entre os pacientes hospitalizados mediada pelos equipamentos médicos e pela equipe de saúde (BOU et al., 2013). O presente estudo analisou a susceptibilidade de dois isolados de *A. baumannii* à

dessecação, onde se observou a presença de crescimento bacteriano nos três tubos contendo os cilindros contaminados dos dois isolados em todos os dias estabelecidos, até o 40º dia de incubação em ambiente escasso de água. Esse resultado reforça a habilidade de *A. baumannii* de sobreviver em condições adversas, relatada por outros estudos (WENDT et al, 1997, JAWAD et al, 1998, BENDINELLI; FRIEDMAN; BERGOGNE-BÉRÉZIN, 2008). Estudo realizado por Giannouli et al (2013) revelou que isolados de *A. baumannii* foram capazes de resistir a dessecação em um período de tempo que variou de 16 a 96 dias, dependendo do isolado. Os fatores moleculares que medeiam à capacidade de *A. baumannii* de resistir à dessecação não são bem compreendidos, embora a descoberta desses determinantes pudesse resultar em estratégias mais eficazes da erradicação desse patógeno (BOLL et al, 2015).

Em 2009, um estudo relatou um surto ocorrido em um Hospital na China em 2006, com contaminação de 2.500 leitos. Após este ocorrido, em 2008, outro hospital foi construído em outra região da cidade de Taiwan a fim de se evitar a contaminação de pacientes por *A. baumannii*. Porém, após quatro meses da inauguração do novo hospital foram relatados novamente casos de pacientes acometidos por infecções secundárias ocasionadas por *A. baumannii*. O mobiliário levado do antigo hospital para o novo foi apontado como responsável por esse novo surto, confirmando a habilidade desse patógeno de persistir por vários meses em condições adversas ao crescimento de outros patógenos (HO et al, 2013).

A eficácia do desinfetante hospitalar para superfície fixa, utilizado no hospital de estudo, foi verificada e comprovada, já que o produto foi capaz de eliminar todas as cepas de referência (*S. aureus*, *P. aeruginosa* e *S. enterica*) preconizadas pelo método da Diluição de Uso. Esse método também foi aplicado para a verificação da susceptibilidade de 10 isolados de *A. baumannii* pertencentes a sete genótipos diferentes. Além disso, quatro possuíam a presença do gene *qacEΔ1* e seus MICs variaram de 800 a 1.800 ppm. Foi usada a diluição do produto recomendada pelo fabricante de 1% e tempo de contato de 10 minutos. Foi verificado que um isolado apresentou susceptibilidade reduzida ao desinfetante estudado, visto que o nº de tubos que apresentou crescimento (n=3) ultrapassou o nº preconizado no ensaio (n=1). Trata-se de um isolado clínico, que apresentou o gene *qacEΔ1* e CIM de 800 ppm. O desinfetante de estudo tem como componente ativo o monopersulfato de potássio. Não existem estudos que associem esse composto específico com a presença do gene *qacEΔ1*, que é conhecido por conferir susceptibilidade reduzida aos quaternários de amônio (WALSH et al, 2005). No presente estudo não foi possível relacionar a presença desse gene com a susceptibilidade ao monopersulfato de potássio, visto que alguns isolados que apresentaram o gene obtiveram CIMs menores que isolados que não apresentaram o gene.

Apesar de estudos relatarem que a resistência aos desinfetantes comumente utilizados provavelmente não é o principal fator na propagação epidêmica de *A. baumannii*, sabe-se que o uso de técnicas incorretas de limpeza e desinfecção de superfícies em serviços de saúde pode estar diretamente relacionado com a disseminação de patógenos multirresistentes e em casos de surtos hospitalares, já que os equipamentos hospitalares podem servir como um reservatório secundário desses micro-organismos. Além disso, a desinfecção incorreta também pode favorecer a pressão seletiva de patógenos (DENTON et al, 2004, WISPLINGHOFF et al, 2007). Diversos estudos já relataram associação da interrupção da transmissão de infecções após o reforço das normas de controle e prevenção de infecções já existentes, como a higienização das mãos, precauções padrão e uma minuciosa limpeza e desinfecção do ambiente (DENTON et al, 2004, KRANIOTAKI et al, 2006, WILKS et al, 2006, ZARRILLI et al, 2007). Para isso, é necessário treinamento de funcionários e conscientização dos impactos do uso incorreto de antissépticos e desinfetantes, além do incentivo de medidas que previnam infecções cruzadas (ROMÃO, 1996, COZAD; JONES, 2003).

Devido à importância de IRAS para a Saúde Pública mundial, estudos sobre a prevalência de micro-organismos envolvidos nessas infecções, bem como os fatores que permitem sua permanência nesses ambientes, são fundamentais para a evolução das ações de prevenção e para o desenvolvimento de estratégias de controle. Apesar dos esforços da Anvisa é fundamental que haja um grande investimento do SUS, com intuito de esclarecimento da abrangência do problema na realidade da população brasileira.

6 CONCLUSÕES

1. Os isolados clínicos de *A. baumannii* provenientes do surto de 2011 e clínicos e ambientais coletados no período de 2014 e 2015 apresentaram altos percentuais de resistência aos antimicrobianos testados, sendo encontrada uma percentagem de 77% de isolados multirresistentes. Além disso, alguns isolados se mostraram resistentes a todas as classes de antimicrobianos testados.
2. Os percentuais de resistência aos carbapenêmicos (imipenem e meropenem), os antimicrobianos de escolha para tratamento de isolados multirresistentes, foram maiores que 80%, tanto com os isolados de 2011 quanto os de 2014-2015.
3. Os antimicrobianos mais ativos contra *A. baumannii* no atual estudo foram a amicacina no surto de 2011 e ampicilina-sulbactam nos isolados clínicos e ambientais do período de 2014-2015.
4. No presente estudo, 68% de todos os isolados foram resistentes à polimixina B.
5. A presença dos genes *bla_{OXA-51}* e *bla_{OXA-23}* foi detectada em 100 % e 82 % dos isolados estudados, respectivamente. A alta percentagem de resistência aos carbapenêmicos encontrada (>80%) pode ser justificada pela presença desse gene. Além disso, a diferença no número de isolados positivos encontrados no surto de 2011 (67%) comparado ao encontrado nos isolados no período de 2014 e 2015 (94%) indica que esse gene tem se propagado ao longo dos anos.
6. Através da técnica de PFGE foram encontrados 16 genótipos diferentes de *A. baumannii*. Os genótipos A e B prevalentes no surto de 2011 se mantiveram presentes nos isolados coletados no período de 2014-2015.
7. O gene *qacEΔ1*, responsável pela susceptibilidade reduzida a desinfetantes à base de quaternário de amônio, foi encontrado em 8% dos isolados.
8. A avaliação da CIM do desinfetante utilizado no hospital de estudo revelou que esses isolados de *A. baumannii* apresentaram altas concentrações inibitórias mínimas.
9. A análise da susceptibilidade à dessecação de dois isolados de *A. baumannii* evidenciou a capacidade de sobrevivência desses isolados em condições adversas por pelo menos 40 dias de incubação.
10. A eficácia do desinfetante utilizado no hospital de estudo foi verificada e comprovada. No entanto, um isolado apresentou susceptibilidade reduzida ao desinfetante.

REFERÊNCIAS

- ABBO, A. et al. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Emerg Infect Dis.**, v.11, p.22-9, 2005.
- ABBOTT, I. et al. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: laboratory challenges, mechanistic insights and therapeutic strategies. **Expert Rev Anti Infect Ther.**, v.11, p.395-409, 2013.
- AKERS, K.S. et al. Aminoglycoside resistance and susceptibility testing errors in *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex. **J Clin Microbiol.**, v.48, n.4, p.1132–1138, 2010.
- AL-AGAMY, M.H. et al. Molecular characterization of carbapenem-insensitive *Acinetobacter baumannii* in Egypt. **Intern J of Infect Dis.**, v. 22, p.49-54, 2014a.
- AL-AGAMY, M.H. et al. Distribution of β -lactamases in carbapenem-non-susceptible *Acinetobacter baumannii* in Riyadh, Saudi Arabia. **J Glob Antimicrob Res.**, v.2, n.1, p.17-21, 2014b.
- AL-MASAUDI, S.B.; DAY, M.J.; RUSSEL, A.D. Antimicrobial resistance and gene transfer in *Staphylococcus aureus*. **J Appl Bacteriol.**, v.70, n.4, p.279-90, 1991.
- AL-SWEIH, N.A.; AL-HUBAIL, M.A.; ROTIMI, V.O. Emergence of tigecycline and colistin resistance in *Acinetobacter* species isolated from patients in Kuwait hospitals. **J Chemother.**, v.23, n.1, p.13-16, 2011.
- ALTUN, H.U. et al. Antimicrobial Susceptibilities of Clinical *Acinetobacter baumannii* Isolates With Different Genotypes. **Jundishapur J Microbiol.**, v.7, n.12, p.e133472014, 2014.
- ANTONIO, C.S. et al. High Prevalence of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Carrying the bla_{OXA-143} Gene in Brazilian Hospitals. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.55, n.3, p.1322-23, 2011.
- ANSI/AAMI - ST 79: 2006- AMERICAN NATIONAL STANDARD ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF MEDICAL INSTRUMENTATION. Disponível em: <http://marketplace.aami.org/eseries/scriptcontent/docs/Preview%20Files%5CST790607-preview.pdf>. Acesso em: 23 mai. 2015.
- ANURADHA, S.; RATHI, M.R.; MATHUR, M.M. Mortality audit of neonatal sepsis secondary to *Acinetobacter*. **J Global Infect Dis.**, v.5, n.1, p.3-7, 2013.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde – **Rede RM: Resistência Microbiana em IPCSL relacionada à CVC em UTI (2012)**. Boletim Informativo – Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde. Ano IV n° 07, Março de 2014.

- ARROYO, L.A. et al. In Vitro activities of tigecycline, minocycline, and colistin-tigecycline combination against multi- And pandrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* group. **Antimicrobial Agents and Chemoth.**, v.53, n.3, p.1295–1296, 2009.
- ASSAD, C.; COSTA, G. **Manual técnico de limpeza e desinfecção de superfícies hospitalares e manejo de resíduos**. Rio de Janeiro: IBAM/COMLURB, 2010. 28 p. Disponível em: <http://comlurb.rio.rj.gov.br/download/MANUAL%20DO%20FUNCIONÁRIO%20%20-%20HOSPITALAR.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2015.
- AYAN, M. et al. Bacteriological, clinical and epidemiological characteristics of hospital-acquired *Acinetobacter baumannii* infection in a teaching hospital. **J Hosp Infect.**, v.54, p.39-45, 2003.
- BARBOLLA, R.E. et al. Identification of an epidemic carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strain at hospitals in Buenos Aires City. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v.45, p.261-264, 2003.
- BABAEI, M.R. et al. Extremely high prevalence of antiseptic resistant quaternary ammonium compound E gene among clinical isolates of multiple drug resistant *Acinetobacter baumannii* in Malaysia. **Ann Clin Microbiol Antimicrob.**, v.14, p.11, 2015.
- BARIN, J. et al. Hetero- and adaptive resistance to polymyxin B in OXA-23-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. **Ann Clin Microbiol Antimicrob.**, v.12, p.15, 2013.
- BAUMANN, P.; DOUDOROFF, M.; STANIER, R.Y. A study of the *Moraxella* group. II. Oxidative-negative species (genus *Acinetobacter*). **J Bacteriol.**, v.95, p.1520-41, 1968.
- BECEIRO, A. et al. Phosphoethanolamine modification of lipid A in colistin-resistant variants of *Acinetobacter baumannii* mediated by the *pmrAB* two-component regulatory system. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.55, p.3370-9, 2011.
- BENDINELLI, M.; FRIEDMAN, H; BERGOGNE-BÉRÉZIN, E. *Acinetobacter* biology and pathogenesis. New York: Springer-Verlag, 2008.
- 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. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates expressing the *bla_{OXA-23}* gene associated with ISAba4 in Belgium. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.52, n.1, p.4205-6, 2008.
- BOLL, J.M. et al. Reinforcing Lipid A acylation on the cell surface of *Acinetobacter baumannii* promotes cationic antimicrobial peptide resistance and desiccation survival. **mBio**, v.6, n. 3, e00478-15, 2015.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Segurança do Paciente em Serviços de Saúde: Limpeza e Desinfecção de Superfícies. **Diário Oficial [da] República Federativa do**

Brasil, Poder Executivo, Brasília, 2010. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4ec6a200474592fa9b32df3fbc4c6735/Manual+Limpeza+e+Desinfeccao+WEB.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 20 dez. 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 1.218, de 14 de agosto de 2012. Institui na Anvisa a Comissão Nacional de Prevenção e Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde (CNCIRAS). **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, 2012. Disponível em: http://www.abih.net.br/wp-content/uploads/Portaria-1218_Cria%C3%A7%C3%A3o-CNCIRAS_ANVISA.pdf. Acesso em: 15 dez. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDCnº 184, de 22 de outubro de 2001. Altera a Resolução 336, de 30 de julho de 1999. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 23 out. 2001. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4ec6a200474592fa9b32df3fbc4c6735/Manual+Limpeza+e+Desinfeccao+WEB.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 20 dez. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Coordenação de Controle de Infecção. Processamento de Artigos e Superfícies em Estabelecimentos de Saúde. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 1994. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4ec6a200474592fa9b32df3fbc4c6735/Manual+Limpeza+e+Desinfeccao+WEB.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 20 dez. 2015.

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

BROSSARD, K.A.; CAMPAGNARI, A.A. The *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein plays a role in adherence to human epithelial cells infect immun. **Infect Immun.**, v.80, p.228–233, 2012.

BUSH, K. Proliferation and significance of clinically relevant β -lactamases. **Ann N Y Acad Sci.**, v.1277, p.84-90, 2013.

BUSH, K.; JACOBY, G.A. Update functional classification of β -lactamases. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.54, p.969-976, 2010.

BUSH, K.; JACOBY, G.A.; MEDEIROS, A.A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.39, p.1211-1233, 1995.

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

CAI, Y. et al. Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. **J Antimicrob Chemother.**, v.67, p.1607-15, 2012.

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

- CATALANO, M. et al. Survival of *Acinetobacter baumannii* on bed rails during an outbreak and during sporadic cases. **J Hosp Infect.**, v.42, p.27-35, 1999.
- CHANG, K. C. et al. Clonal spread of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in eastern Taiwan. **J Microbiol Immunol Infect.**, v.45, n.1, p.37-42, 2012.
- CHIANG, M. C. et al. Clinical characteristics and outcomes of bacteremia due to different genomic species of *Acinetobacter baumannii* complex in patients with solid tumors. **Infection**, v. 40, p.19–26, 2012.
- CHIN, C-Y. et al. A PmrB-regulated deacetylase required for lipid A modification and polymyxin resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.59, p.7911–7914, 2015.
- CHUANG, Y. C. et al. Influence of genospecies of *Acinetobacter baumannii* complex on clinical outcomes of patients with *Acinetobacter* bacteremia. **Clin Infect Dis.**, v.52, p.352–60, 2011.
- CICEK, A. C. et al. OXA- and GES-type b-lactamases predominate in extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from a Turkish University Hospital. **Clin Microbiol Infect.**, v. 20, n.5, p.410-5, 2013.
- ÇİÇEK, A. Ç. Et al. Detection of class 1 integron in *Acinetobacter baumannii* isolates collected from nine hospitals in Turkey **Asian Pac J Trop Biomed.**, v.3, n.9, p.743-747, 2013.
- CIESLINSKI, J. M. et al. 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.**, v.77, p.337-340, 2013.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twentieth Informational Supplement. CLSI document M100-S23. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013.
- COELHO, F. et al. Velhos Problemas, novos desafios. **Rev Tecn Hospitalar.**, v.43, p.30-32, 2011.
- COELHO, J. et al. Occurrence of OXA-58-like carbapenemases in *Acinetobacter* spp. collected over 10 years in three continents. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.50, p.756-758, 2006a.
- COELHO, J. M. et al. Occurrence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clones at multiple hospitals in London and Southeast England. **J Clin Microbiol.**, v.44, p.3623-27, 2006b.
- COMERT, F. B. et al. First isolation of vancomycin-resistant enterococci and spread of a single clone in a university hospital in northwestern Turkey. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, v.26, n.1, p.57-61, 2007.

- CORNAGLIA, G. et al. Metallo-beta-lactamases as emerging resistance determinants in Gram-negative pathogens: open issues. **Int J Antimicrob Agents.**, v.29, n.4, p.380-8, 2007.
- CORTIVO, G. D. et al. Antimicrobial resistance profiles and oxacillinase genes in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from hospitalized patients in Santa Catarina, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v.48, n.6, p.699-705, 2015.
- COZAD, A.; JONES, R.D. Disinfection and the prevention of infectious disease. **Am J Infect Control.**, v.31, n.4, p.243-54, 2003.
- DA SILVA, G.J. et al. Long-term dissemination of an OXA-40 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* clone in the Iberian Peninsula. **J Antimicrob Chemother.**, v.54, p.255-258, 2004.
- DAI, N. et al. Drug-resistant genes carried by *Acinetobacter baumannii* isolated from patients with lower respiratory tract infection. **Chin Med J (Engl).**, v.123, n.18, p.2571-5, 2010.
- DAVIS, K.A. et al. Multidrug-resistant *Acinetobacter* extremity infections in soldiers. **Emerg Infect Dis.**, v.11, p.12-18, 2005.
- DE BREIJ, A. et al. Do biofilm formation and interactions with human cells explain the clinical success of *Acinetobacter baumannii*? **PLoS one.**, v.5, n.5, e10732, 2010.
- DENTON, M. et al. Role of environmental cleaning in controlling an outbreak of *Acinetobacter baumannii* on a neurological intensive care unit. **J Hosp Infect.**, v.56, p.106-10, 2004.
- DIJKSHOORN, L.; NEMEC, A.; SEIFERT, H. An increasing threat in hospitals: multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. **Nat Rev Microbiol.**, v.5, p.939-51, 2007.
- DORTET, L. et al. Bacterial identification, clinical significance, and antimicrobial susceptibilities of *Acinetobacter ursingii* and *Acinetobacter schindleri*, two frequently misidentified opportunistic pathogens. **J Clin Microbiol.**, v.44, p.4471-78, 2006.
- DRABICK, J.J. et al. Covalent polymyxin B conjugate with human immunoglobulin G as an antiendotoxin reagent. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.42, p.583-588, 1998.
- EVEILLARD, M.; JOLY-GUILLOU, M.L. Emerging *Acinetobacter baumannii* infections and factors favouring their occurrence. **Pathol Biol.**, v.60, p.314-19, 2012.
- FALAGAS, M. E. et al. Pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* infections: characteristics and outcome in a series of 28 patients. **Int J Antimicrob Agents.**, v.32, n.5, p.450-454, 2008.
- FERNANDES, A.T. Infecção Hospitalar e suas interfaces na Área da Saúde. São Paulo: Atheneu, 2000.
- FERNÁNDEZ-CUENCAA, F. et al. Actividad de 18 agentes antimicrobianos frente a aislados clínicos de *Acinetobacter baumannii*: segundo estudio nacional multicéntrico (Proyecto GEIH-REIPI-Ab 2010). **Enferm Infecc Microbiol Clin.**, v.31, n.1, p.4-9, 2013.

FIESTER, S.E.; ACTIS, L.A. Stress responses in the opportunistic pathogen *Acinetobacter baumannii*. **Future Microbiol.**, v.8, n.3, p.353-365, 2013.

FIGUEIREDO, D. Q. et al. First report of the bla(OXA-58) gene in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii* in Rio de Janeiro, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v.106, n.3, p.368-70, 2011.

FIGUEIREDO, S. et al. In vivo selection of reduced susceptibility to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* related to ISAb1-mediated overexpression of the natural bla_{OXA-66} oxacillinase gene. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.53, p.2657-9, 2009a.

FIGUEIREDO, S. et al. Overexpression of the naturally occurring bla_{OXA-51} gene in *Acinetobacter baumannii* mediated by novel insertion sequence ISAb9. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.52, p.4045-7, 2009b.

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

FORBES, B.A.; SAHM, D.F.; WEISSFELD, A.S. **Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology**. 10^a ed. St. Louis: Mosby. 1998.

FOUAD, M. et al. Emergence of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* harboring the OXA-23 carbapenemase in intensive care units of Egyptian hospitals. **Int J Infect Dis.**, v.17, n.12, p.e1252-4, 2013.

FOURNIER, P.E.; RICHET, H. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. **Clin Infect Dis.**, v.42, p.692-699, 2006.

GADDY, J.A.; ACTIS, L.A. Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. **Future Microbiol.**, v.4, p.273-278, 2009.

GALES, A. C.; JONES, R. N.; SADER, H. S. Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006–09). **J Antimicrob Chemother.**, v.66, p.2070-4, 2011.

GALES, A. C. et al. Genotypic characterization of carbapenem-nonsusceptible *Acinetobacter* spp. isolated in Latin America. **Microb Drug Resist.**, v.10, p.286-291, 2004.

GARNER, J.S. The hospital infection control practices advisory committee. Guideline for isolation precautions in hospital. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, v.17, p. 54-80, 1996.

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

GIANNOULI, M. et al. Virulence-related traits of epidemic *Acinetobacter baumannii* strains belonging to the international clonal lineages I-III and to the emerging genotypes ST25 and ST78. **BMC Infectious Diseases.**, v.13, p.282, 2013.

- GIRARDELLO, R.; GALES, A. C. Resistência às Polimixinas: velhos antibióticos, últimas opções terapêuticas. **Revista de epidemiologia e controle de infecção**, v.2, n.2, p.66-69, 2012.
- GIRLICH, D. et al. OXA-253, a variant of the carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase OXA-143 in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.58, n.5, p.2976-8, 2014.
- GUARDABASSI, L.; DALSGAARD, A.; OLSEN, J.E. Phenotypic characterization and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp. isolated from aquatic sources. **J Appl Microbiol.**, v.87, p.659-67, 1999.
- GUNDI, V.A. et al. Validation of partial *rpoB* gene sequence analysis for the identification of clinically important and emerging *Acinetobacter* species. **Microbiol.**, v.155, p.2333-41, 2009.
- GUR, D. et al. Increasing carbapenem resistance due to the clonal dissemination of oxacillinase (OXA-23 and OXA-58)-producing *Acinetobacter baumannii*: report from the Turkish SENTRY Program sites. **J Medical Microbiol.**, v.57, p.1529-1532, 2008.
- HAMMOUDI, D. et al. Spread of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* co-expressing OXA-23 and GES-11 carbapenemases in Lebanon. **Intern J of Infect Dis.**, v.36, p.56–61, 2015.
- HANCOCK, R. E. W.; CHAPPLE, D. S. Peptide antibiotics. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.43, p.1317–23, 1999.
- HAWLEY, J.S.; MURRAY, C.K.; JORGENSEN, J.H. Colistin heteroresistance in *Acinetobacter* and its association with previous colistin therapy. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.52, n.1, p.351-2, 2008.
- HÉRITIER, C. et al. Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.49, p.4174–9, 2005.
- HIGGINS, P.G. et al. Global spread of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii*. **J Antimicrob Chemother.**, v.65, p.233-8, 2010.
- 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, p.305–14, 2010.
- HIGGINS, P. G. et al. OXA-143, a novel carbapenem hydrolyzing class D β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.53, p.5035-8, 2009.
- HIGGINS, P.G. et al. OXA-235, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.57, p.2121-26, 2013.
- HINRICHSEN, S.L. et al. Limpeza Hospitalar: Importância no Controle de Infecções. In: HINRICHSEN, S.L. **Biossegurança e Controle de Infecções. Risco Sanitário Hospitalar.** Rio de Janeiro: Medsi, p. 175-203, 2004.

- HO, C-M. et al. Repeated colonization by multi-drug-resistant *Acinetobacter calcoaceticus*-*A. baumannii* complex and changes in antimicrobial susceptibilities in surgical intensive care units. **Surg Infect.**, v.14, n.1, p.43-8, 2013.
- HORTON, J.; PANKEY, G.A. Polymyxin B, colistin, and sodium colistimethate. **Med Clin N Am.**, v.66, p.135-142, 1982.
- HOU, T.W. et al. Microbiology and clinical analysis of six cases of hospital-acquired pneumonia caused by *Acinetobacter baumannii*. **Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi.**, v.30, n.1, p.35-9, 2007.
- HOWARD, A. et al. *Acinetobacter baumannii*: An emerging opportunistic pathogen. **Virulence.**, v.3, p.243-250, 2012.
- HUANG, S. S.; DATTA, R.; PLAT, R. Risk of acquiring antibiotic-resistant bacteria from prior room occupants. **Arch Intern Med.**, v.166, n.16, p.1945-51, 2006.
- IKONOMIDIS, A. et al. Discordance of meropenem versus imipenem activity against *Acinetobacter baumannii*. **Int J Antimicrob Agents.**, v.28, p.376-377, 2006.
- JAWAD, A. et al. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates. **J Clin Microb.**, v.36, n.7, p.1938-1941, 1998.
- JONES, R.N. et al. Determination of epidemic clonality among multidrug-resistant strains of *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* in the MYSTIC Programme (USA, 1999-2003). **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v.49, n.3, p.211-216, 2004.
- JUNG, S. et al. False susceptibility to amikacin by VITEK 2 in *Acinetobacter baumannii* harboring *armA*. **Ann Clin Lab Sci.**, v.40, n.2, p.167-71, 2010.
- KANAFANI, Z.A.; KANJ, S.S. Clinical manifestations of *Acinetobacter* infection. 2008. Disponível em: <<http://www.uptodate.com>> . Acessado em: 10 mai. 2014.
- KEMPF, M. et al. Investigation of *Acinetobacter baumannii* resistance to carbapenems in Marseille hospitals, south of France: a transition from an epidemic to an endemic situation. **APMIS.**, v.121, n.1, p.64-71, 2013.
- KO, K. S. et al. High rates of resistance to colistin and polymyxin B in subgroups of *Acinetobacter baumannii* isolates from Korea. **J Antimicrob Chemother.**, v.60, n.5, p.1163-7, 2007.
- KOH, T.H. et al. *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex species in clinical specimens in Singapore. **Epidemiol Infect.**, v.140, n.3, p.535-8, 2012.
- KRANIOTAKI, E. et al. Molecular investigation of an outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*, with characterisation of class 1 integrons. **Int J Antimicrob Agents.**, v.28, p.193-9, 2006.

- KÜCKEN, D.; FEUCHT, H.; KAULFERS, P. Association of *qacE* and *qacEΔ1* with multiple resistance to antibiotics and antiseptics in clinical isolates of Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiol Lett.**, v.183, p.95-98, 2000.
- 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, p.49–54, 2008.
- LEE, K. et al. High prevalence of ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* and increase of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp.in Korea: a KONSAR program in 2004. **Yonsei Med J.**, v.47, n.5, p.634-45, 2006.
- LEE, Y.T. et al. Emergence of carbapenem-resistant non-*baumannii* species of *Acinetobacter* harboring a *bla_{OXA-51}*-like gene that is intrinsic to *A. baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.56, n.2, p.1124-7, 2012.
- LEE, Y. T. et al. First identification of *bla_{OXA-51}*-like in non- *baumannii* *Acinetobacter* spp. **J Chemother.**, v.21, n.5, p.514-20, 2009.
- LI, J. et al. Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.50, n.9, p.2946-50, 2006.
- LIM, T. P. et al. Multiple genetic mutations associated with polymyxin resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.59, n.12, p.7899-902, 2015.
- LIMA, A.L.; OLIVEIRA, P.R.; PAULA, A.P. *Acinetobacter* infection. **N Engl J Med.**, v.358, n.26, p.2846-7, 2008.
- LLACA-DÍAZ, J.M. et al. One-year surveillance of ESKAPE pathogens in an intensive care unit of Monterrey, Mexico. **Chemotherapy.**, v.58, n.6, p.475-81, 2012.
- LLEWELLYN, A. C. et al. NaxD is a deacetylase required for lipid A modification and *Francisella* pathogenesis. **Mol Microbiol.**, v.86, n.3, p.611-27, 2012.
- LOLANS, K. et al. Multicity outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing the carbapenemase OXA-40. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.50, p.2941-2945, 2006.
- LOPES, B.S.; AL-HASSAN, L.; AMYES, S. G. IS*Aba825* controls the expression of the chromosomal *bla_{OXA-51}*-like and the plasmid borne *bla_{OXA-58}* gene in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* isolated from the USA. **Clin Microbiol Infect.**, v.18, p.E446–E451, 2012.
- LPSN BACTERIO.NET. List of prokaryotic names with standing in nomenclature. 2015
Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/a/acinetobacter.html>> Acessado em: 18 set. 2015.
- MANIKAL, V. M. et al. Endemic carbapenem-resistant *Acinetobacter* species in Brooklyn, New York: citywide prevalence, interinstitutional spread, and relation to antibiotic usage. **Clin Infect Dis.**, v.31, p.101-106, 2000.

- INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. POP 65.3210.007: método da Diluição de Uso. Rev. 10. Rio de Janeiro, 2013. 10. 21 p. (Manual da Qualidade. Seção 10).
- MARAGAKIS, L.; PERL, M. *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. **Clin Infect Dis.**, v.46, p.1254-1263, 2008.
- MARCHAIM, D. et al. Outbreak of colistin-resistant, carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in metropolitan Detroit, Michigan. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.55, p.593-9, 2011.
- MARRA, A.R. et al. The Brazilian SCOPE Study Group Nosocomial Bloodstream Infections in Brazilian Hospitals: Analysis of 2,563 Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study. **J Clin Microbiol.**, v.49, n.5, p.1866–71, 2011.
- MARTÍNEZ, P.; MATTAR, S. Imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the *isaba1-bla_{oxa-23, 51}* and *isaba1-bla_{adc-7}* genes in Monteria, Colombia. **Braz J Microbiol.**, n.43, n.3, p. 1274-80, 2012.
- MARTINS, A.; HUNYADI, A.; AMARAL, L. Mechanisms of resistance in bacteria: an evolutionary approach. **Open Microbiol J.**, v.7, p.53-58, 2013.
- MCCONNELL, M.J.; ACTIS, L.; PACHON, J. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. **FEMS Microbiol Rev.**, v.37, p.130-55, 2013.
- McDONNELL, G.; RUSSEL, A.D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. **Clin Microbiol Rev.**, v.12, n.1, p.147-179, 1999.
- MENDES, C.A.C.; BURDMANN, E.A. **Rev Assoc Med Bras.**, v.55, n.6, p.752-9, 2009.
- METAN, G. et al. Clonal diversity and high prevalence of OXA-58 among *Acinetobacter baumannii* isolates from blood cultures in a tertiary care centre in Turkey. **Infect Genet Evol.**, v.14, p.92-97, 2013.
- MIGLIAVACCA, R. et al. Characterization of resistance mechanisms and genetic relatedness of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from blood, Italy. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v.75, p.180-186, 2013.
- MUGNIER, P. D. et al. Worldwide dissemination of the bla_{OXA-23} carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. **Emerg Infect Dis.**, v.16, n.1, p.35-40, 2010.
- MUGNIER, P.D.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Functional analysis of insertion sequence IS_{Aba1}, responsible for genomic plasticity of *Acinetobacter baumannii*. **J Bacteriol.**, v.191, p.2414–8, 2009.
- MURRAY, P.R. et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 9. ed. Washington: ASM Press, 2007.

NATIONAL CENTER FOR INFECTIOUS DISEASES (CDC). Division of Bacterial and Mycotic Diseases, Foodborne and Diarrheal Diseases Branch. Subtipificación de patógenos bacterianos de transmisión alimentaria. **Manual de Procedimientos Laboratório** – Traducción del “Standardized Molecular Subtyping of Foodborne Bacterial Pathogens by Pulsed-Field Gel Electrophoresis”. Buenos Aires, 2004.

NCBI. National Center for Biotechnology Information. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/taxonomy/>>. Acessado em: 15 dez.2015.

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

NEMEC, A.; DIJKSHOORN, L.; VAN DER REIJDEN, T. J. Long-term predominance of two pan-European clones among multi-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in the Czech Republic. **J Med Microbiol.**, v.53, p.147-53, 2004.

NIU, C. et al. Isolation and characterization of an autoinducer synthase from *Acinetobacter baumannii*. **J Bacteriol.**, v.190, n.9, p.3386-92, 2008.

NORSKOV-LAURITSEN, N.; MARCHANDIN, H.; DOWZICKY, M.J. Antimicrobial susceptibility of tigecycline and comparators against bacterial isolates collected as part of the TEST study in Europe (2004–2007). **Int J Antimicrob Agents.**, v.34, n.2, p.121-30, 2009.

NOSKIN, G.A. et al. Persistent contamination of fabric covered furniture by vancomycin-resistant enterococci: implications for upholstery selection in hospitals. **Am J Infect Control.**, v.28, p.311-313, 2000.

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

OLIVEIRA, A. **Infecções Hospitalares, Epidemiologia, Prevenção e Controle**. Rio de Janeiro: Medsi, 2005.

OLIVEIRA, A. C.; DAMASCENO, Q. S. Superfícies do ambiente hospitalar como possíveis reservatórios de bactérias resistentes: uma revisão. **Rev Esc Enferm USP.**, v.44, n.4, p.1118-23, 2010.

ÖZCAN, N. et al. OXA carbapenemase genes in multidrug-resistant *A. baumannii* strains in southeast of Turkey. **SMU Medical Journal.**, v.2, n.2, p.21-32, 2015.

PELCZAR, M.J. et al. **Microbiologia, conceitos e aplicações**. São Paulo: Makron Books, 1997.

PELEG, A. Y.; HOOPER, D. C. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. **N Engl J Med.**, v.362, p.1804–13, 2010.

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

PEREIRA, D.C.R. **Caracterização da resistência de isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* a antimicrobianos e desinfetante hospitalar.** Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária; Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, 2013.

PÉRICHON, B. et al. Sequence of conjugative plasmid pIP1206 mediating resistance to aminoglycosides by 16S rRNA methylation and to hydrophilic fluoroquinolones by efflux. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 52, n. 7, p. 2581-2, 2008.

POGUE, J.M.; COHEN, D.A.; MARCHAIM, D. Polymyxin-resistant *Acinetobacter baumannii*: urgent action needed. **Clin Infect Dis.**, v.60, n.9, p.1304-7, 2015.

POIREL, L.; NAAS, T.; NORDMANN, P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. **Antimicrob agent Chemother.**, v.54, p.24-38, 2010.

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

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

PRADO, A. et al. Caracterización fenotípica de aislamientos de *Acinetobacter baumannii* en una institución de salud de alta complejidad de Cali. **Biomédica**, v.34, p.101-7, 2014.

PREFEITURA MUNICIPAL DE RIBEIRÃO PRETO – SP. Secretaria Municipal de Saúde. Comissão de Controle de Infecção – CCI – SMS. **Limpeza e Desinfecção de Superfícies em Serviços de Saúde.** Ribeirão Preto; SMS-RP, 2006. Acesso em: dez.2015.

RAJAMOHAN, G.; SRINIVASAN, V. B.; GEBREYES, W. A. Novel role of *Acinetobacter baumannii* RND efflux transporters in mediating decreased susceptibility to biocides. **J Antimicrob Chemother.**, v.65, p.228-232, 2010.

RAY, A.J et al. Nosocomial transmission of vancomycin-resistant enterococci from surfaces. **JAMA**, v. 287, p. 1400-11, 2002.

REICHEL, M. et al. Efficacy of surface disinfectant cleaners against emerging highly resistant gram-negative bacteria. **BMC Infectious Diseases.**, v.14, p.292, 2014.

REIS, A.O. et al. Polymyxin-resistant *Acinetobacter* spp. isolates: what is next? **Emerg Infect Dis.**, v.9, n.8, p.1025-1027, 2003.

ROBERTS, S. A.; FINDLAY, R.; LANG, S. D. Investigation of an outbreak of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* in an intensive care burns unit. **J Hospital Infection.**, v.48, p.228-232, 2001.

- RODRIGUEZ, C. H. et al. Selection of colistin resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in post neurosurgical meningitis in an intensive care unit with high presence of heteroresistance to colistin. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v.65, n.2, p.188-191, 2009.
- ROMÃO, C. et al. Presence of *qacEΔ1* gene and susceptibility to a hospital biocide in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* resistant to antibiotics. **Curr Microbiol.**, v.63, n.1, p.16-21, 2011.
- ROMÃO, C.M.A. Desinfecção e esterilização química. In: TEIXEIRA, P., VALE, S. (Org.). **Biossegurança – Uma Abordagem Multidisciplinar**. 1. ed., Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1996. P. 133-62.
- RUIZ, M. et al. High prevalence of carbapenem-hydrolysing oxacillinases in epidemiologically related and unrelated *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Spain. **Clin Microbiol Infect.**, v.13, p.1192-1198, 2007.
- RUTALA, W.A.; WERBER, D.J. The benefits of surface disinfection. **Am J Infect Control.**, v.32, p.226-231, 2004.
- PARTRIDGE, S. R. et al. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. **FEMS Microbiol Rev.**, v.33, n.4, p.757–84, 2009.
- SANSCHAGRIN, F.; COUTURE, F.; LEVESQUE, R. C. Primary structure of OXA-3 and phylogeny of oxacillin-hydrolyzing class D beta-lactamases. **Antimicrob Agent Chemother.**, v.39, n.4, p.887-93, 1995.
- SAMPLE, M.L. et al. An outbreak of vancomycin-resistant Enterococci in a Hematology–Oncology Unit: control by patient cohorting and terminal cleaning of the environment. **Infect Control Hosp Epidemiol.**, v.23, p.468-69, 2002.
- SAULE, M. et al. Dissemination of a carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strain belonging to international clone II/sequence type 2 and harboring a novel AbaR4-like resistance island in Latvia. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 57, n. 2, p.1069-72, 2013.
- SCOTT, P.; DEYE, G.; SRINIVASAN, A. An outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex infection in the US military health care system associated with military operations in Iraq. **Clin Infect Dis.**, v.44, n.12, p.1577-1584, 2007.
- SHAHCHERAGHI, F. et al. Isolation and genetic characterization of metallo-beta-lactamase and carbapenamase producing strains of *Acinetobacter baumannii* from patients at Tehran hospitals. **Iranian J of Microbiol.**, v.3, p.68-74, 2011.
- SILVA, R. N. P. **A Importância do *Acinetobacter baumannii* na Infecção Adquirida nos Cuidados de Saúde**. Mestrado Integrado em Medicina, Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar – Universidade do Porto. Porto, 2009.
- SMOLYAKOV, R. et al. Nosocomial multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* bloodstream infection: risk factors and outcome with ampicillin-sulbactam treatment. **J Hosp Infect.**, v.54, n.1, p.32-38, 2003.

- SNITKIN, E. S. et al. Genomic insights into the fate of colistin resistance and *Acinetobacter baumannii* during patient treatment. **Genome Res.**, v.23, p.1155–62, 2013.
- SOHRABI, N. et al. Prevalence of OXA-type beta-lactamases among *Acinetobacter baumannii* isolates from Northwest of Iran. **Microb Drug Resist.**, v.18, p.385-89, 2012.
- TENOVER, F. C. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J Clin Microbiol.**, v.33, n.9, p.2233-9, 1995.
- TOMASINO, S. Disinfectants. In: **Official Methods of Analysis**. 19th ed. Association of Official Analytical Chemists, cap. 6, 2012.
- TORRES, A. et al. Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*: clinical update and new highlights. **Rev Esp Quimioter.**, v.23, p.12-19, 2010.
- TOUATI, M. et al. Emergence of *bla*_{OXA-23} and *bla*_{OXA-58} carbapenemase-encoding genes in multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from University Hospital of Annaba, Algeria. **Int J Antimicrob Agents.**, v.40, p. 89-91, 2012.
- TURTON, J.F. et al. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the *bla*_{OXA-51}-like carbapenemase gene intrinsic to this species. **J Clin Microbiol.**, v.44, p.2974–6, 2006a.
- TURTON, J.F. et al. The role of IS*Aba1* in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. **FEMS Microbiol Lett.**, v.258, p.72-7, 2006b.
- TURTON, J. F. et al. Incidence of *Acinetobacter* species other than *A. baumannii* among clinical isolates of *Acinetobacter*: evidence for emerging species. **J Clin Microbiol.**, v.48, p.1445-49, 2010.
- VALENTINE, S. C. et al. Phenotypic and molecular characterization of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from nosocomial outbreaks in Los Angeles County, California. **J Clin Microbiol.**, v.46, n.8, p.2499-2507, 2008.
- VAN DEN BROEK, P. J. et al. Endemic and epidemic *Acinetobacter* species in a university hospital: an 8-year survey. **J Clin Microbiol.**, v.47, p.3593–9, 2009.
- WALSH, T. R. et al. Metallo-β-lactamases: the quiet before the storm? **Clin Microbiol Rev.**, v.18, p.306-25, 2005.
- WEBER, D. J. et al. Role of hospital surfaces in transmission of emerging healthcare-associated pathogens. In: Rutala WA, editor. **Disinfection, sterilization, and antisepsis**. Washington, DC: Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology, Inc; 2010.
- WEBER, D. J.; RUTALA, W.A.; SICKBERT-BENNETT, E.E. Outbreaks associated with contaminated Antiseptics and Disinfectants. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.51, p.4217–24, 2007.

- WENDT, C. et al. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. **J Clin Microbiol.**, v.35, n.6, p.1394-7, 1997.
- WILKS, M. et al. Control of an outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* colonization and infection in an intensive care unit (ICU) without closing the ICU or placing patients in isolation. **Infect Control Hosp Epidemiol.**, v.27, p.654-658, 2006.
- WISPLINGHOFF, H. et al. Resistance to disinfectants in epidemiologically defined clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **J Hosp Infect.**, v.66, n.2, p.174–181, 2007.
- WOODFORD, N. et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. **Int J Antimicrob Agents.**, v.27, n.4, p.351-3, 2006.
- WYBO, I. et al. Outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a Belgian university hospital after transfer of patients from Greece. **J Hosp Infect.**, v.67, n.4, p.374-80, 2007.
- XIN, F. et al. Exploring the diversity of *Acinetobacter* populations in river water with genus-specific primers and probes. **J Gen Appl Microbiol.**, v.60, p.51-8, 2014.
- YAU, W. et al. Colistin hetero-resistance in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from the Western Pacific region in the SENTRY antimicrobial surveillance programme. **J Infect.**, v.58, n.2, p.138-44. 2009.
- YIN, X.L. et al. Detection of drug resistance-associated genes of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Microb Drug Resist.**, v.14, n.2, p.145-50, 2008.
- YUM, J. H. et al. Molecular characterization of metallo-beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomospecies 3 from Korea: identification of two new integrons carrying the bla (VIM-2) gene cassettes. **J Antimicrob Chemother.**, v.49, p.837–40, 2002.
- ZARRILLI, R. et al. Molecular epidemiology of a clonal outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a university hospital in Italy. **Clin Microbiol Infect.**, v.13, p.481-9, 2007.
- ZARRILLI, R. et al. Molecular epidemiology of sequential outbreaks of *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit shows the emergence of carbapenem resistance. **J Clinical Microbiol.**, v.42, n.3, p.946-53, 2004.
- ZARRILLI, R. et al. Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. **Int J Antimicrob Agents.**, v.41, n.1, p.11-19, 2013.