

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Vanessa Cordeiro Dias

**RESISTÊNCIA AOS CARBAPENÊMICOS E VIRULÊNCIA DE
Acinetobacter baumannii e *Pseudomonas aeruginosa* ISOLADOS DE UM
SERVIÇO DE SAÚDE TERCIÁRIO**

Juiz de Fora
Dezembro/2015

VANESSA CORDEIRO DIAS

**RESISTÊNCIA AOS CARBAPENÊMICOS E VIRULÊNCIA DE
Acinetobacter baumannii e *Pseudomonas aeruginosa* ISOLADOS DE UM
SERVIÇO DE SAÚDE TERCIÁRIO**

Tese de Doutorado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias, para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas na área de Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias.

Orientadores:

Prof^a. Dr^a. Vânia Lúcia Silva

Prof. Dr. Cláudio Galuppo Diniz (co-orientador)

Juiz de Fora
Dezembro/2015

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Cordeiro Dias, Vanessa.

RESISTÊNCIA AOS CARBAPENÊMICOS E VIRULÊNCIA DE Acinetobacter baumannii e Pseudomonas aeruginosa ISOLADOS DE UM SERVIÇO DE SAÚDE TERCIÁRIO / Vanessa Cordeiro Dias. -- 2015.

118 f. : il.

Orientadora: Vânia Lúcia da Silva

Coorientador: Cláudio Galuppo Diniz

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2015.

1. resistência. 2. Acinetobacter. 3. Pseudomonas. 4. carbapenêmicos. I. Lúcia da Silva, Vânia, orient. II. Galuppo Diniz, Cláudio, coorient. III. Título.

VANESSA CORDEIRO DIAS

**RESISTÊNCIA AOS CARBAPENÊMICOS E VIRULÊNCIA DE
Acinetobacter baumannii e *Pseudomonas aeruginosa* ISOLADOS DE UM
SERVIÇO DE SAÚDE TERCIÁRIO**

Tese de Doutorado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias, para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas na área de Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias.

Aprovada em: 18/12/2015

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Vânia Lucia da Silva
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof^a. Dra. Ana Carolina Morais Apolônio
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Guilherme Côrtes Fernandes
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof^a. Dra. Luciana Debórtoli de Carvalho
Universidade Estadual de Santa Cruz

Prof^a. Dra. Juliana Alves Resende
Faculdade de Minas – FAMINAS-Muriaé

Dedico este trabalho ao meu “velhinho”
Paulo Gomes, grande incentivador e
colaborador para a realização deste sonho.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório Côrtes Villela pela oportunidade que me foi concedida.

Ao Hospital Albert Sabin pela colaboração, parceria e acolhida.

À minha família pelas orações e presença nesta caminhada.

À minha orientadora, Prof^a Vânia Lucia da Silva, exemplo de competência, postura e sucesso profissional, minha imensa gratidão. Muito obrigada pela oportunidade de prosseguir nos estudos, pela confiança, pelo conhecimento científico, pelos ensinamentos, pela amizade e pela orientação. Agradeço também por ter acreditado que eu seria capaz de realizar este trabalho, embora a dupla jornada. Toda gratidão é pouca!!!

Ao meu co-orientador, Prof^o Cláudio Galuppo Diniz, pelo apoio científico, suporte técnico, amizade, confiança, ensinamentos, correções e sugestões. Enorme gratidão também por ter me aberto as portas da vida acadêmica. Obrigada pelas oportunidades concedidas e por acreditar no meu potencial. Seus conhecimentos e a dedicação em transformar seus alunos em cientistas, me fizeram ver além das minhas limitações! Muito obrigada!!!

Ao Dr. Marinho, Dr. Ricardo e Dr. André pela confiança, amizade, apoio, carinho e incentivo. Muito obrigada por ajudarem a transformar um sonho em realidade.

Ao Flávio Januário, Alessandro Guimarães e Renato Barbosa pela valiosa contribuição na pesquisa dos dados registrados no sistema de informática do Laboratório Côrtes Villela.

Ao Maurício Soares Ferreira pelos ensinamentos, amizade e incentivo.

Ao meu “velhinho” Paulo Gomes, José Moreira e Ana Cláudia, minha sincera gratidão pelo apoio e pela colaboração na execução de muitos serviços.

Aos demais colegas do Laboratório Côrtes Villela pela convivência, respeito e apoio.

À Aline Sampaio, pela ajuda incansável na execução das inúmeras tarefas, atenção, carinho e dedicação.

À amiga Thaís Oliveira pelo companheirismo, carinho, amizade, apoio e incentivo.

Aos Prof. Dr. Guilherme Côrtes e Prof^a. Dra. Ana Carolina Apolônio que participaram da minha banca de Qualificação e moldaram o meu trabalho com sugestões, críticas, elogios e conhecimentos.

Aos funcionários e docentes do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia pela cooperação técnica e por colocarem à minha disposição toda a infraestrutura física de seus laboratórios.

Às secretárias do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Laura, Fernanda e Graça, pela atenção e ajuda.

Aos amigos que fiz durante o curso que de uma forma ou de outra me ajudaram nesta conquista.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia e Genética Molecular Bacteriana, em especial à Alessandra Ferreira, pela ajuda na concretização dos experimentos e pelo aprendizado compartilhado.

A Deus, por ter colocado todas essas pessoas em minha vida e também por iluminar sempre meu caminho.

RESUMO

As bactérias Gram-negativas não fermentadoras, como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*, estão amplamente disseminadas no ambiente e estão cada vez mais associados a infecções nosocomiais graves. O uso extensivo e indiscriminado de antibióticos tem contribuído para um aumento do número de infecções causadas por *A. baumannii* e *P. aeruginosa* resistentes a uma grande variedade de agentes antimicrobianos, incluindo β -lactâmicos. O objetivo deste trabalho foi avaliar características fisiológicas e moleculares da resistência aos carbapenêmicos em *P. aeruginosa* e *A. baumannii* isolados em um hospital terciário. A partir de estudos com amostras clínicas de pacientes admitidos num hospital terciário foram isolados, em 2012, *A. baumannii* (n=44) e *P. aeruginosa* (n=28) resistentes aos carbapenêmicos e em 2013, *P. aeruginosa* (n=19) e *A. baumannii* (n=44) com igual fenótipo. As amostras bacterianas recuperadas em 2012 foram submetidas a testes de susceptibilidade aos antimicrobianos. Marcadores genéticos relacionados com a síntese de β -lactamases *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-58} e *bla*_{OXA-143} foram testados por PCR. A partir das linhagens isoladas no estudo de 2013, testes fisiológicos foram realizados para avaliar a atividade hemolítica, estresse oxidativo, tolerância aos biocidas, formação de biofilme e determinação da resistência aos antimicrobianos. Marcadores genéticos relacionados com a síntese de β -lactamases (*ampC*, *bla*_{KPC}, *bla*_{SIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{VIM}, *bla*_{GIM}, *bla*_{OXA} e *bla*_{NDM-1}), sistemas de efluxo (*adeB*, *mexB*, *mexD*, *mexF* e *mexY*) e perda de porina (*oprD*) foram pesquisados por PCR. Foram analisados dados epidemiológicos de todos os pacientes avaliados. No estudo de 2012, a polimixina B foi a única droga eficaz para todos os isolados. Os marcadores genéticos foram observados apenas em isolados de *Acinetobacter*. O genótipo mais frequente observado foi *bla*_{OXA-23+}/*bla*_{OXA-51}⁺ (45,5%), seguido por *bla*_{OXA-51}⁺/*bla*_{OXA-143}⁺ (41%). Os genes *bla*_{OXA-24} e *bla*_{OXA-58} não foram detectados. Uma elevada taxa de mortalidade foi observada (> 70%) entre os pacientes. No estudo de 2013, idade avançada, predomínio de indivíduos internados em UTI, uso de dispositivos médicos invasivos, como cateter venoso, tratamento anterior com fluoroquinolonas ou β -lactâmicos em combinação com um inibidor da β -lactamase e estadia prolongada no hospital foram fatores predisponentes para infecção por estes microrganismos. Colistina demonstrou atividade, *in vitro*, contra todas as amostras bacterianas avaliadas. Tigeciclina foi também efetiva para linhagens de *A. baumannii*. *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos não foi capaz de produzir hemolisinas. Essas linhagens foram menos tolerantes ao estresse oxidativo e alguns biocidas, mas mostraram um aumento da capacidade de formação de biofilme em relação aos isolados sensíveis. Os principais mecanismos de resistência presentes em linhagens de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos foi síntese de oxacilinases (OXA-23, OXA-51 e OXA-143), ausência de *oprD* e presença de bomba de efluxo (AdeABC). Em *P. aeruginosa* foram encontrados genes para bombas de efluxo (MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY-OprM), *bla*_{SPM-1}, além de ausência de *oprD*. Estes resultados confirmam a dificuldade de manejo terapêutico de pacientes com infecções associadas a microrganismos multirresistentes, com impacto direto na mortalidade e controle epidemiológico dessas linhagens nos centros de saúde.

Palavras chaves: resistência, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, carbapenêmicos, porina, efluxo, carbapenemases

ABSTRACT

The non-fermenting Gram-negative bacteria, such as *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* are widespread in the environment and are increasingly associated with severe nosocomial infections. Extensive and indiscriminate use of antibiotics has contributed to an increased number of infections caused by *A. baumannii* and *P. aeruginosa* that are resistant to a wide variety of antimicrobials, including β -lactams. This study aimed to evaluate physiological and molecular characteristics of carbapenem resistance in *P. aeruginosa* and *A. baumannii*. From studies with clinical samples from patients admitted to a tertiary hospital, were isolated in 2012 *A. baumannii* (n=44) and *P. aeruginosa* (n=28) resistant to carbapenems and in 2013, *P. aeruginosa* (n=19) and *A. baumannii* (n=44) with similar phenotype. The bacterial samples recovered in 2012 were submitted to antibiotic susceptibility testing. Genetic markers related to β -lactamases synthesis *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-58} and *bla*_{OXA-143} were screened by PCR. From strains recovered in the 2013 study, physiological tests were performed to evaluate hemolytic activity, oxidative stress, biocides tolerance and biofilm formation, besides determination of antimicrobial resistance patterns. Genetic markers related to β -lactamases synthesis (*ampC*, *bla*_{KPC}, *bla*_{SIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{VIM}, *bla*_{GIM}, *bla*_{OXA} and *bla*_{NDM-1}), efflux systems (*adeB*, *mexB*, *mexD*, *mexF* and *mexY*) and loss of porin (*oprD*) were screened by PCR. Epidemiological data about all of these patients were analyzed. In the 2012 study, polymyxin B was the only effective drug for all isolates. Genetic markers were observed only in *Acinetobacter* isolates. The most frequent genotype observed was *bla*_{OXA-23}⁺/*bla*_{OXA-51}⁺ (45,5%), followed by *bla*_{OXA-51}⁺/*bla*_{OXA-143}⁺ (41%). The genes *bla*_{OXA-24} and *bla*_{OXA-58} were not detected. High mortality rate (> 70%) between the patients was observed. In a prospective study, advanced age, predominance of individuals hospitalized in ICU, use of invasive medical devices, such as venous catheter, previous treatment with fluoroquinolones or β -lactams in combination with β -lactamase inhibitor and prolonged stay in hospital were predisposing factors for infection by these microorganisms. Colistin has shown activity, *in vitro*, against all assessed bacterial samples. Tigecycline was also effective for strains of *A. baumannii*. Carbapenem-resistant *P. aeruginosa* was not able to produce hemolysin. These strains were less tolerant to oxidative stress and some biocides, but they showed increased ability of biofilm formation in relation to susceptible isolates. The major mechanisms of carbapenems resistance present in *A. baumannii* strains was oxacilinases synthesis (OXA-23, OXA-51 and OXA-143), *oprD* absence and efflux pump presence (AdeABC). In *P. aeruginosa* was found genes encoding efflux pumps (MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY-OprM) and *bla*_{SPM-1}; besides *oprD* absence. These results confirm the difficulty of therapeutic management of patients with infections associated with multidrug resistant microorganisms, with direct impact on mortality and epidemiological control of multidrug-resistant strains in health centers.

Key words: resistance, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, carbapenems, porine, efflux, carbapenemases

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
AB	Ampicilina-sulbactam
ABR	Abril
AGO	Agosto
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AT	Aztreonam
ATCC	American Type Culture Collection
AK	Amicacina
β	Beta
pb	Pares de base
BGNF	Bactéria Gram-negativa não fermentadora de glicose
C	Citosina
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CP	Ciprofloxacina
DEZ	Dezembro
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ENFF	Enfermaria feminina
ENFM	Enfermaria masculina
ESBL	Beta-lactamase de espectro estendido
FEV	Fevereiro
G	Guanina
GIM	German Imipenemase
GM	Gentamicina
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
IH	Infecção hospitalar
IMP	Imipenemase
IP	Imipenem
IRAS	Infecções relacionadas à assistência a saúde
JAN	Janeiro
JUN	Junho
JUL	Julho
MAI	Maio
MAR	Março
MBL	Metallo-beta-bactamase
μL	Microlitro
MG	Minas Gerais
MP	Meropenem
NDM	New Delhi Metallo-beta-lactamase
NOV	Novembro
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
OMP	“Outer membrane protein” – Outra proteína de membrana
OR	<i>Odds ratio</i>
OUT	Outubro
OXA	Oxacilinase
PBP	“Penicillin binding proteins” – Proteínas ligadoras de penicilinas
PCR	“Polymerase chain reaction” – Reação em cadeia da polimerase

PM	Cefepime
PT	Piperacilina-tazobactam
SET	Setembro
SIM	Seoul Imipenemase
SPM	São Paulo metalo-beta-lactamase
T	Timina
TE	Tetraciclina
TS	Sulfazotrim
TSB	“Tryptic Soy Broth” – Caldo Trypticaseína de Soja
TZ	Ceftazidima
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo
UTI-N	Unidade de Tratamento Intensivo em Neonatologia
UC	Unidade Coronariana
USA	Estados Unidos da América
VIM	Verona Imipenemase

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Pag.
Figura 1. Estrutura química dos principais β -lactâmicos. Fonte: Samaha-Kfoury & Araj (2003)	21
Quadro 1. Grupos de β -lactâmicos em uso na terapia antimicrobiana. Fonte: Samaha-Kfoury & Araj (2003); CLSI (2015)	22
Quadro 2. Classes de β -lactamases com atividade hidrolítica frente aos carbapenêmicos. Fonte: Ambler <i>et al.</i> , 1991	25
Figura 2. Delineamento experimental	39
Figura 3. Conjunto de eletroforegramas representativos da amplificação dos diferentes marcadores moleculares avaliados neste estudo: A - <i>bla</i> _{SPM-1} (649pb); B - <i>OprD</i> (191pb); C - <i>ampC</i> (166pb); D - <i>adeB</i> (90pb); E - <i>bla</i> _{OXA-2} (700pb); F - <i>bla</i> _{OXA-10} (760pb); G - <i>mexB</i> (244pb); H - <i>mexD</i> (165pb); I - <i>mexF</i> (255pb); J - <i>mexY</i> (250pb); K - <i>bla</i> _{OXA-23} (501pb); L - <i>bla</i> _{OXA-143} (149pb); M - <i>bla</i> _{OXA-51} (353pb).PM – Marcador de peso molecular (pb)	62

LISTA DE TABELAS

	Pag.
Tabela 1. Oligoiniciadores utilizados neste estudo e tamanho dos fragmentos	42
Tabela 2. Aspectos clínicos-epidemiológicos dos pacientes com quadro infeccioso por <i>A. baumannii</i> e/ou <i>P. aeruginosa</i> resistentes aos carbapenêmicos, hospitalizados entre janeiro e dezembro de 2012	50
Tabela 3. Perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas entre os isolados de <i>A. baumannii</i> e <i>P. aeruginosa</i> resistentes aos carbapenêmicos, durante o ano de 2012	51
Tabela 4. Características fenotípicas e genotípicas de <i>A. baumannii</i> e <i>P. aeruginosa</i> resistentes aos carbapenêmicos isolados de pacientes hospitalizados entre janeiro e dezembro de 2012	53
Tabela 5. Aspectos clínicos-epidemiológicos dos pacientes com quadro infeccioso por <i>A. baumannii</i> e/ou <i>P. aeruginosa</i> resistente aos carbapenêmicos, hospitalizados entre janeiro e dezembro de 2013	57
Tabela 6. Perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas entre os isolados de <i>A. baumannii</i> e <i>P. aeruginosa</i> resistentes aos carbapenêmicos, durante o ano de 2013	58
Tabela 7. Avaliação da habilidade de formação de biofilme e tolerância ao estresse oxidativo de <i>P. aeruginosa</i> sensível e resistente aos carbapenêmicos	59
Tabela 8. Avaliação da tolerância aos biocidas entre isolados de <i>P. aeruginosa</i> sensíveis e resistentes aos carbapenêmicos	60
Tabela 9. Correlação entre características fisiológicas e tolerância a biocidas e resistência a carbapenêmicos em linhagens de <i>P. aeruginosa</i> isoladas em um hospital terciário	61
Tabela 10. Frequência de detecção dos genes associados à resistência aos carbapenêmicos	61
Tabela 11. Características fenotípicas e genotípicas de <i>A. baumannii</i> e <i>P. aeruginosa</i> resistentes aos carbapenêmicos isolados de pacientes hospitalizados entre janeiro e dezembro de 2013	64

SUMÁRIO

	Pag.
1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 INFECÇÃO HOSPITALAR	18
2.2 ANTIMICROBIANOS β -LACTÂMICOS	20
2.3 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS β -LACTÂMICOS	24
2.4 <i>Acinetobacter baumannii</i>	25
2.5 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31
3 OBJETIVOS	36
3.1 OBJETIVOS GERAIS	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4 MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	38
4.2 IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA	40
4.3 ESTUDO ANO 2012	40
4.3.1 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos	40
4.3.2 Extração de DNA bacteriano	41
4.3.3 Identificação dos genes <i>bla_{OXA}</i> entre as bactérias resistentes aos carbapenêmicos por PCR	41
4.3.4 Revisão dos prontuários dos pacientes	43
4.4 ESTUDO ANO 2013	43
4.4.1 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos	43
4.4.2 Avaliação fisiológica de habilidades bacterianas associadas à agressão	43
4.4.2.1 Avaliação da habilidade de formação de biofilme	44
4.4.2.2 Avaliação da atividade hemolítica	44
4.4.2.3 Avaliação da tolerância ao estresse oxidativo	45
4.4.2.4 Avaliação da tolerância aos biocidas	46
4.5 EXTRAÇÃO DE DNA BACTERIANO	46
4.6 IDENTIFICAÇÃO DOS MARCADORES GENÉTICOS POR PCR	47
4.7 REVISÃO DOS PRONTUÁRIOS DOS PACIENTES	47
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
5 RESULTADOS	49
5.1 ESTUDO ANO 2012	49
5.2 ESTUDO ANO 2013	56

6 DISCUSSÃO	67
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	74
8 CONCLUSÕES	75
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
10 ANEXOS	98
10.1 ANEXO 1	98
11. APÊNDICES	100
11.1 ARTIGO 1	100
11.2 ARTIGO 2	117

1 INTRODUÇÃO

Um dos principais problemas de saúde pública, na atualidade, é a escassez de alternativas terapêuticas para tratamento de infecções nosocomiais causadas por bactérias multirresistentes. Isto se deve, principalmente, a pouco empenho e investimento no desenvolvimento e síntese de novos fármacos e à alta capacidade adaptativa das bactérias diante da pressão seletiva exercida por diversos antibióticos.

Pesquisas recentes destacam o importante papel das bactérias Gram negativas não fermentadoras de glicose no panorama da resistência múltipla. Dentre essas bactérias, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* são aquelas de maior relevância clínica, pois são frequentemente isoladas em laboratórios de microbiologia clínica e responsáveis por elevados índices de mortalidade.

Os β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmico) são inibidores ativos da síntese da parede celular e, mesmo associados ou não aos inibidores de β -lactamases (ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam), constituem a principal classe de antimicrobianos utilizada na prática médica.

Os carbapenêmicos são drogas de escolha para o tratamento de infecções hospitalares graves motivadas por bactérias multirresistentes e os principais mecanismos expressos por linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*, incluem a produção de β -lactamases, alterações nas proteínas de membrana externa (porinas) e bombas de efluxo. Os mais relevantes, no entanto, são decorrentes da produção de β -lactamases adquiridas, incluindo serina- β -lactamases, como KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) as MBL (metalo-beta-lactamases) (NDM – New Delhi metalo-beta-lactamase, IMP - imipenemase, VIM – Verona imipenemase, GIM – German imipenemase, SIM – Seoul imipenemase e SPM – São Paulo metalo-beta-lactamase) e as OXA's (oxacilinas).

Outra característica importante observada em linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*, que as fazem, provavelmente, ser consideradas como patógenos nosocomiais de sucesso é a versatilidade metabólica que os tornam aptos para sobreviver por longos períodos de tempo em superfícies bióticas e abióticas, tolerando a dessecação e outras condições hostis; e a

capacidade de expressar inúmeros fatores de virulência importantes para estabelecer uma infecção. A habilidade de formação de biofilme é um dos fatores de virulência mais importantes no contexto da resistência aos antimicrobianos e desinfetantes, principalmente no ambiente hospitalar.

Assim, o conhecimento da epidemiologia, da dinâmica de disseminação e circulação dos marcadores genéticos de resistência a drogas, associado a informações sobre expressão de fatores de virulência, constituem um dado de relevância clínica, pois possibilita a instauração de uma terapia antimicrobiana mais adequada, bem como a adoção de medidas eficazes que visem à prevenção e desaceleração da perda gradativa desses fármacos do nosso arsenal terapêutico.

Assim, dando sequência à linha de pesquisa “Epidemiologia da resistência e resposta bacteriana aos antimicrobianos”, do Laboratório de Fisiologia e Genética Molecular Bacteriana, com este trabalho, pretende-se avaliar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, investigar a expressão de fatores de virulência, bem como determinar os mecanismos genéticos de resistência aos carbapenêmicos em linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* isoladas de espécimes clínicos de pacientes internados num hospital terciário, em Juiz de Fora, MG. As informações geradas poderão contribuir para a construção de bancos de dados para vigilância epidemiológica a cerca da resistência bacteriana a drogas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 INFECÇÃO HOSPITALAR

Infecção hospitalar (IH) é considerada, conforme Portaria 2.616, de 12 de maio de 1998, do Ministério da Saúde, válida até o momento, como toda infecção que se desenvolve após a internação ou é produzida por microrganismos adquiridos durante a hospitalização do paciente ou quando da realização de procedimentos invasivos neste tipo de instituição, sendo excluídas as infecções que já estavam presentes ou em período de incubação antes da admissão. Tais infecções podem ser de origem endógena, quando são causadas pela microbiota do paciente, ou exógena “quando resultam da transmissão a partir de fontes externas ao paciente” (GARNER *et al.*, 1988; BRASIL, 1998; BRACHMAN, 1998; FERNANDES, 2000).

O termo IH vem sendo substituído nos últimos anos pela expressão “Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde” (IRAS), no qual a prevenção e o controle das infecções passam a ser considerados para todos os locais onde se presta o cuidado e a assistência à saúde. Sendo assim, o hospital não é o único local onde se pode adquirir uma infecção, podendo existir o risco em procedimentos ambulatoriais, serviços de hemodiálise, casas de repouso para idosos, instituições para doentes crônicos, assistência domiciliar (“*home care*”) e clínicas odontológicas. No entanto, para estudos restritos ao ambiente hospitalar, o termo IH é ainda aceito (MEDEIROS, WEY e SILVA, 2005).

A IH é reconhecida mundialmente como um importante problema de saúde pública, devido a sua relação com o aumento da mortalidade, incapacidade física temporária ou permanente, o que ocasiona grandes custos diretos e indiretos. Está também relacionada com o grau de desenvolvimento dos hospitais e de seus equipamentos, uso indiscriminado de antimicrobianos, causando impacto humano, econômico e social (SANTOS, 2004; KLEVENS *et al.*, 2007; DING *et al.*, 2009).

A incidência de IH difere de um país para outro, assim como de uma instituição para outra, e depende de fatores como o público alvo de atendimento, porte dos hospitais, especialidades médicas disponíveis, condições de higiene e

eficácia de programas de controle de IH implementados (FOGLIA, FRASER e ELWARD, 2007; JERASSY *et al.*, 2006; ROSENTHAL *et al.*, 2010).

Estima-se que em países desenvolvidos, ocorram IH em cerca de 2 a 18% dos pacientes internados, podendo chegar até cerca de 21 a 54%, quando consideram-se os pacientes internados em UTI (MACHADO, 2001). Outros estudos relataram taxas de 5 a 10% em pacientes adultos, enquanto em alas pediátricas, as taxas são de aproximadamente 15% (MIREYA *et al.*, 2007; PITTET *et al.*, 2008).

No Brasil, dados sobre IH ainda são subnotificados, gerando dificuldade na obtenção de taxas reais de infecção (NOGUEIRA *et al.*, 2009). Desta forma, estima-se que a incidência nacional de IH atinja uma taxa superior a 720.000 casos por ano e, que destes, 20% dos pacientes (144.000) evolua para óbito (MARTINS *et al.*, 2008; SOUSA *et al.*, 2009; OLIVEIRA & BETTCHER, 2010).

Pneumonia é a mais comum e mais grave infecção adquirida em ambiente hospitalar, embora outras manifestações clínicas também já tenham sido relatadas, como infecções de trato urinário, sepse, infecções de sítios cirúrgicos, dentre outras (DIJKSHOORN *et al.*, 2007; OLIVEIRA, KOVNER e SILVA, 2010).

Existem pacientes que apresentam condições que predispõem ao desenvolvimento da IH, quando comparados aos demais. Dentre estas, estão aquelas inerentes ao próprio indivíduo (idade prematura ou avançada, doença de base - diabetes, insuficiência renal, câncer, distúrbios cardíacos - imunossupressão); estadia prolongada em hospital, procedimento médico invasivo (cateter venoso, sonda urinária, traqueostomia) e terapia prévia com antimicrobianos (SIROY *et al.*, 2005; FOGLIA, FRASER e ELWARD, 2007; SLAMA, 2008; CEZÁRIO *et al.*, 2009; PARKINS *et al.*, 2010; WIBBENMEYER *et al.*, 2010).

Embora fungos, vírus e parasitas sejam reconhecidos como agentes de IH, as bactérias são os principais responsáveis por infecções adquiridas neste ambiente (SANTOS, 2004). Um dos grandes problemas, no meio hospitalar, é a emergência de bactérias com perfil de resistência a múltiplos antimicrobianos, pois resulta em gastos financeiros, índices de mortalidade e tempo de hospitalização ainda mais elevados que quando comparados a infecções causadas por bactérias da mesma espécie que não apresentam essa característica (FOGLIA, FRASER e ELWARD, 2007).

A escassez de alternativas terapêuticas para combater infecções nosocomiais severas causadas por bactérias multirresistentes é motivada pelo pouco

investimento, por parte das indústrias farmacêuticas, para o desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos e pela alta versatilidade adaptiva das bactérias de relevância clínica, perante a pressão seletiva exercida por diversos antibióticos (LIVERMORE e WOODFORD, 2006; KRESSER, BELSEY e ROVINI, 2007).

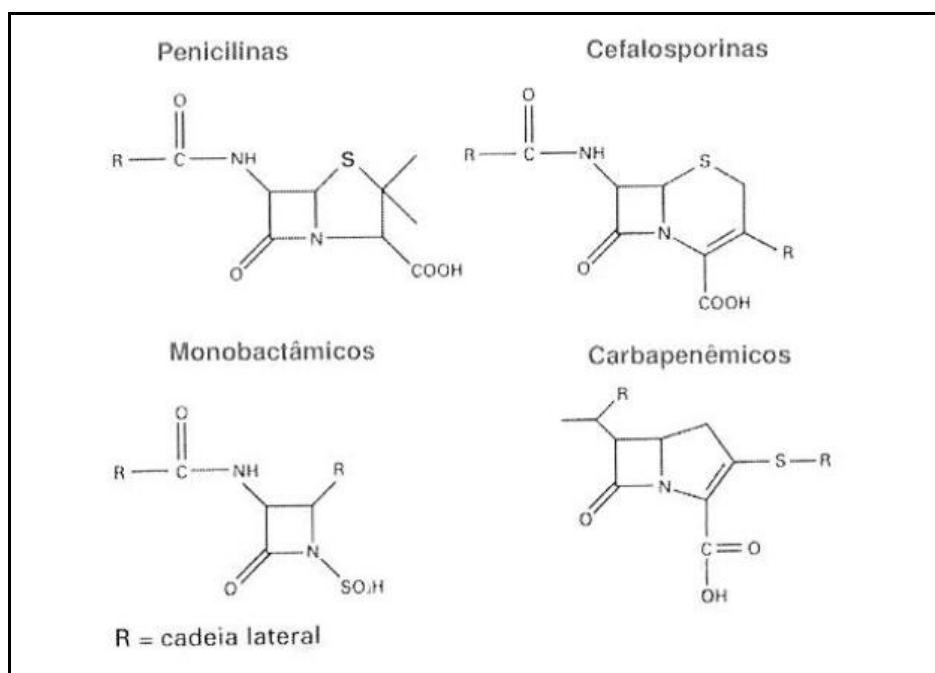
Trabalhos apontam *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* como espécies bacterianas frequentemente envolvidas em casos de surtos de IH, exibindo resistência, tanto intrínseca quanto adquirida, a várias classes de antibióticos (DIJKSHOORN *et al.*, 2007; SLAMA, 2008; OLIVEIRA, KOVNER e SILVA, 2010; CHOLLEY *et al.*, 2011; GALES, *et al.*, 2012).

2.2 ANTIMICROBIANOS β -LACTÂMICOS

Os antimicrobianos são substâncias com baixo peso molecular capazes de provocar alterações que promovem a morte (bactericida) ou inibição do crescimento e da reprodução bacteriana (bacteriostático). São vários os seus mecanismos de ação: inibição da síntese da parede celular, alteração da permeabilidade da membrana citoplasmática, além de interferência na replicação do DNA e na síntese protéica (MURRAY *et al.*, 2004; RANG *et al.*, 2004).

Os β -lactâmicos representam a classe de antimicrobianos mais variada e mais amplamente utilizada na rotina médica (BERTONCHELI e HÖRNER, 2008). Sua ampla utilização deve-se principalmente ao fato de possuírem alta toxicidade seletiva, boa ação antimicrobiana e atividade modulada de acordo com as características moleculares do anel β -lactâmico. Atuam como inibidores da síntese da parede celular bacteriana, estrutura vital para estes microrganismos e inexistente nas células humanas, o que a torna o foco de atenção para o desenvolvimento de novas drogas (SAMAH-KFOURY e ARAJ, 2003).

Figura 1: Estrutura química dos principais β -lactâmicos. Fonte: Samaha-Kfoury & Araj (2003)



De acordo com sua estrutura molecular, os compostos β -lactâmicos são divididos em 4 grupos: penicilinas, cefalosporinas, monobactâmico e carbapenêmicos (Figura 1 e Quadro 1). A base da estrutura molecular destas substâncias é um anel β -lactâmico, que é essencial para o mecanismo de ação dessas drogas na parede celular bacteriana (Figura 1) (LIVERMORE e WILLIAMS, 1996). Tal anel também é o alvo de atuação das enzimas (β -lactamases) envolvidas na resistência bacteriana a estes compostos. A estrutura química destes fármacos vem sendo frequentemente manipulada, para se obter maior atividade e mais aplicações terapêuticas (SAMAH-KFOURY e ARAJ, 2003).

Quadro 1. Drogas β -lactâmicas em uso na terapia antimicrobiana. Fonte: Samaha-Kfoury & Araj (2003); CLSI (2015)

Penicilinas	Penicilina G, penicilina V
	Penicilinas resistentes a penicilinase: meticilina, nafcilina, oxacilina, cloxacilina
	Aminopenicilinas: ampicilina, amoxicilina
	Carboxipenicilinas: carbenicilina, ticarcilina
	Ureidopenicilinas: mezlocilina, piperacilina
Cefalosporinas	1ª Geração: cefazolina, cefalotina, cefalexina
	2ª Geração: cefuroxima, cefaclor, cefamandol, cefamicinas (cefotetan, ceftaxidima)
	3ª Geração: cefotaxima, ceftriaxona, cefpodoxima, ceftizoxima, cefoperazona, ceftazidima
	4ª Geração: cefepime, ceftipime
Monobactâmico	Aztreonam
Carbapenêmicos	Imipenem, meropenem, ertapenem e doripenem

As penicilinas constituem um dos grupos mais importantes entre os antibióticos β -lactâmicos. A primeira penicilina foi descoberta por Alexander Fleming em 1928 e, uma década mais tarde, através de pesquisas conduzidas por Florey, Chain e Abraham, tornaram-se agentes terapêuticos sistêmicos (BRUNTON, LAZO e PARKER, 2006). As penicilinas mais antigas, como a benzilpenicilina, são obtidas de culturas de *Penicillium chrysogenum*, enquanto as mais recentes são semi-sintéticas, obtidas por incorporação de grupamentos químicos ao anel β -lactâmico (RANG, DALE e RITTER, 2001). A penicilina G e a penicilina V são, de modo geral, bastante ativas contra cocos Gram-positivos, apesar de demonstrarem-se ineficazes contra algumas linhagens de *Staphylococcus aureus*, sendo rapidamente hidrolisadas por penicilinases. Em contrapartida, penicilinas resistentes à penicilinases, como meticilina, oxacilina e cloxacilina são consideradas alternativas de escolha para o tratamento de infecções por *Staphylococcus aureus* produtores de penicilinases. Penicilinas como ampicilina e amoxicilina constituem um grupo de drogas com ação melhorada sobre bactérias Gram-negativas, como *Haemophilus influenzae* e representantes da família *Enterobacteriaceae*, tais como *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis* (BRUNTON, LAZO e PARKER, 2006).

As cefalosporinas são agentes antimicrobianos semi-sintéticos derivados do fungo *Cephalosporium acremonium* (ROCHA *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Do ponto de vista clínico, é comum agrupar esses compostos em quatro gerações, de acordo com algumas características estruturais e microbiológicas afins (MELLA *et al.*, 2001). As cefalosporinas de primeira geração, como cefalexina, cefalotina e cefazolina apresentam boa atividade sobre cocos Gram-positivos, como *S. aureus* sensível a metilicina, *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus pneumoniae*. No entanto, carecem de atividade sobre *Enterococcus spp.* Sua atividade sobre bacilos Gram-negativos é limitada a linhagens de *E. coli*, *Klebsiella spp* e *P. mirabilis* não produtores de β -lactamases (MELLA *et al.*, 2001). As cefalosporinas de segunda geração, como cefuroxima e cefoxitina, exibem uma atividade ligeiramente aumentada contra microrganismos Gram negativos, mas muito menos ativas do que os agentes de terceira geração (BRUNTON, LAZO e PARKER, 2006). Apresentam como característica marcante a sua atividade sobre *H. influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria meningitidis* e *Neisseria gonorrhoea*. Apresentam também maior atividade sobre enterobactérias resistentes a cefalotina, como linhagens de *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Providencia* e *Proteus*, quando comparada às de primeira geração. A terceira geração inclui cefalosporinas de amplo espectro de ação, como ceftriaxona, ceftazidima e cefotaxima. Apesar de normalmente serem menos ativas do que as de primeira geração contra cocos Gram positivos, exibem atividade muito maior contra as enterobactérias, incluindo linhagens produtoras de β -lactamases clássicas (BRUNTON, LAZO e PARKER, 2006). As cefalosporinas de quarta geração, como cefepime, possuem um maior espectro de ação quando comparadas às de terceira geração.

O monobactâmico, aztreonam, é usado principalmente como uma alternativa aos aminoglicosídeos para o tratamento de infecções por bactérias Gram negativas, em especial as enterobactérias, como *E. coli* e *Klebsiella spp*, e *P. aeruginosa*. São comumente utilizados em infecções urinárias, cutâneas, respiratórias, especialmente aquelas nosocomiais, intra-abdominais, ginecológicas e septicemia (HELLINGER e BREWER, 1999; GALES *et al.*, 2012).

Os carbapenêmicos, como imipenem e mais recentemente doripenem, foram instituídos como alternativas terapêuticas para combater infecções nosocomiais graves, provocadas, principalmente por bactérias Gram negativas multirresistentes, como aquelas produtoras de ESBL (beta-lactamase de espectro estendido). A presença do anel β -lactâmico dá a estas substâncias a propriedade de agir com elevada potência contra cocos e bacilos Gram positivos e Gram negativos, aeróbios

e anaeróbios (BRUNTON, LAZO e PARKER, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2009). No entanto, apesar de boa atividade bactericida, sua utilização clínica deve ser restrita, uma vez que os carbapenêmicos podem induzir a resistência em bacilos Gram negativos, reduzindo drasticamente as opções terapêuticas (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Importantes compêndios oficiais (EUCAST/2013 e CLSI/2014) recomendam o uso clínico de determinados antimicrobianos β -lactâmicos, como cefalosporinas de terceira e quarta geração (ceftazidima e cefepime, por exemplo), imipenem, meropenem e piperacilina-tazobactam como opções para tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa* e *A. baumannii*. Ampicilina-sulbactam é também recomendado para *A. baumannii*.

2.3 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS β -LACTÂMICOS

À medida que os diferentes agentes de pressão seletiva, como os saneantes e as drogas antimicrobianas são introduzidos no ambiente, os microrganismos respondem, podendo se tornar resistentes a eles. Algumas espécies bacterianas são consideradas naturalmente resistentes aos antimicrobianos (resistência intrínseca). Outras, sob exposição continuada a estes compostos, podem apresentar resistência adquirida, decorrente do desenvolvimento de novos mecanismos de defesa. Estes mecanismos adquiridos resultam em alterações na fisiologia celular e na estrutura microbiana devido a alterações genéticas (WITTE, 2000; O'BRIEN, 2002).

A resistência bacteriana aos antimicrobianos e outros compostos pode se apresentar sob diferentes fenômenos bioquímicos. Do ponto de vista genético, a resistência pode ser mediada por genes cromossômicos (via mutações ou alterações na expressão gênica), por genes situados em elementos extracromossomais, tais como plasmídeos ou, ainda, em elementos móveis do próprio genoma, como os transposons e os integrons (ODELSON *et al.*, 1987; RANG *et al.*, 2004; SERRANO, 2005). Desta forma, estas modalidades de resistência, tanto a mutação (cromossômica) quanto a transferível (via elementos extracromossomais/móveis) podem estar presentes na mesma bactéria.

Os principais mecanismos bacterianos de resistência aos fármacos β -lactâmicos descritos na literatura são: (i) alteração do sítio ativo da droga na bactéria: os β -lactâmicos são capazes de se ligar a PBP's (Proteínas ligadoras de

penicilinas) que são alvos ativos específicos na bactéria. Se esse sítio (PBP's) for alterado, o quimioterápico não pode efetivar a ligação e torna-se ineficiente contra o microrganismo; (ii) alteração da permeabilidade da membrana: a alteração na expressão dos canais de porina modifica a penetração e conseqüentemente a ação de diferentes antibióticos; (iii) efluxo ativo de antibióticos: propriedade de expulsar ativamente os antibióticos para fora da célula, contribuindo para uma concentração inadequada da droga e, conseqüentemente, ação não efetiva (bomba de fluxo); (iv) produção de enzimas capazes de inativar a droga, tais como as β -lactamases, que são enzimas capazes de catalisar a hidrólise de amidos, amidinas e outras ligações C-N, separando a base do substrato (Quadro 2) (PEREZ *et al.*; 2007; PFEIFER, CULLIK e WITTE, 2010).

Quadro 2. Classes de β -lactamases com atividade hidrolítica frente aos carbapenêmicos. Fonte: Ambler *et al.*, 1991

Classe	Principais enzimas carbapenemases
A	KPC
B (MBL)	IMP, VIM, SIM, SPM, NDM, GIM
D (OXA)	OXA-23, OXA-24, OXA-51, OXA-58, OXA-143

Outras enzimas como ESBL (tipo CTX-m, SHV e TEM) e ampC (classe C de Ambler), de origem cromossômica e/ou plasmidial, apresentam atividade hidrolítica restrita às penicilinas, cefalosporinas e monobactâmico, sem atuação frente aos carbapenêmicos (AMBLER *et al.*, 1991).

O uso extensivo de antimicrobianos β -lactâmicos cada vez mais frequente tem ocasionado pressão seletiva, evidenciando, deste modo, as bactérias multi-resistentes. Tal fenômeno possui impacto direto na escolha da terapia antimicrobiana mais adequada, contribuindo para o insucesso terapêutico e por vezes, a morte do paciente acometido por este tipo de infecção.

2.4 *Acinetobacter baumannii*

Acinetobacter baumannii é uma bactéria pertencente à família *Moraxellaceae* (GIAMARELLOU *et al.*, 2008), com característica morfo-tintorial compatível com

cocobacilo Gram negativo. Apresenta colônias com características semelhantes às de *Enterobacteriaceae*, pois em ágar sangue forma colônia branco-acinzentada e em ágar MacConkey colônia levemente rosada, cremosa ou mucóide (PELEG *et al.*, 2008).

É uma bactéria ubíqua, aeróbia estrita, catalase positiva, oxidase negativa, não fastidiosa, não fermentadora de glicose, que pode ser facilmente recuperada de diversas fontes, como solo, água, produtos alimentares e artigos médicos (TOMARAS *et al.*, 2003; PELEG *et al.*, 2008).

O gênero *Acinetobacter* compreende 23 espécies nomeadas e 11 espécies com denominações provisórias (NEMEC *et al.*, 2010). A espécie *A. baumannii* é o representante mais importante, sendo considerado o patógeno mais relevante para as instituições de saúde (PELEG *et al.*, 2008). Causa uma variedade de IH oportunistas, incluindo infecções de trato urinário e respiratório, circulação sanguínea, pele, tecidos moles e pneumonia associada à ventilação mecânica, especialmente em indivíduos internados em unidade de tratamento intensivo (GORDON & WAREHAM, 2010).

Acinetobacter baumannii possui requisitos nutricionais simples, sendo capaz de adaptar-se a amplas faixas de temperatura e pH, diferentes níveis de salinidade e umidade (IACONO *et al.*, 2008). Neste contexto, vários estudos evidenciam *Acinetobacter baumannii* sobrevivendo em superfícies de equipamentos de aspiração, colchões, travesseiros, umidificadores, grades de cama, dentre outros sítios hospitalares (PATERSON, 2006; TORRES *et al.*, 2010).

A identificação de espécies bacterianas pertencentes ao gênero *Acinetobacter* baseada apenas em esquemas compostos por provas fenotípicas é geralmente insuficiente. A utilização de técnicas e métodos de biologia molecular para a correta caracterização das espécies deste gênero é recomendada. (DIJKSHOORN *et al.*, 2007). A identificação da espécie *A. baumannii* pode ser realizada pela detecção da presença do gene *blaOXA-51*. Este marcador ocorre naturalmente no cromossomo desta espécie, sendo caracterizado como um gene intrínseco (TURTON *et al.*, 2006).

Relatos da presença de microrganismos de relevância epidemiológica, por longos períodos, em superfícies secas, e particularmente naquelas que podem ser tocadas com as mãos de profissionais de saúde, enfatizam o potencial do ambiente como possível reservatório de infecções (OBASI *et al.*, 2009; GORDON e

WAREHAM, 2010). Essa bactéria pode também ser encontrada colonizando a pele de pessoas saudáveis (SCHRECKENBERGER *et al.*, 2007).

Infecções nosocomiais causadas por *A. baumannii* são difíceis de tratar, devido à resistência intrínseca apresentada frente a drogas antimicrobianas e desinfetantes, como triclosan e clorexidina (WISPLINGHOFF *et al.*, 2007). O microrganismo possui habilidade de aderir e formar biofilmes em superfícies bióticas ou abióticas, como marca-passos, catéter intravenoso e urinário, válvulas cardíacas, reservatórios de água, dentre outros instrumentos (TOMARAS *et al.*, 2003; HALL-STOODLEY *et al.*, 2004). Outros importantes fatores de virulência encontrados em linhagens desta espécie são: habilidade em captar o ferro do meio ambiente, sobrevivendo em condições deficitárias deste elemento, produção de cápsula polissacarídica e de estruturas relacionadas à aderência, como as fímbrias (WROBLEWSKA *et al.*, 2008; SMANI *et al.*, 2012).

Outra característica marcante é a capacidade surpreendente de adquirir marcadores genéticos de resistência a diferentes classes de antimicrobianos: tetraciclina, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, maioria dos β -lactâmicos, incluindo carbapenêmicos (DIJKSHOORN *et al.*, 2007; PELEG *et al.*, 2008; SHAHCHERAGHI *et al.*, 2011).

Carbapenêmicos são consideradas drogas de escolha para tratamento de infecções motivadas por bactérias Gram negativas multirresistentes. Entretanto, a resistência de *A. baumannii* a estas drogas tem aumentado em todo o mundo nas últimas décadas (CORREA *et al.*, 2012; OPAZO *et al.*, 2012; MEDEIROS & LINCOPAN, 2013). Surtos hospitalares envolvendo *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos apresentam grande impacto clínico e epidemiológico, e têm sido amplamente descritos na literatura (DIJKSHOORN *et al.*, 2007; PELEG *et al.*, 2008; PEREZ *et al.*, 2010).

Os principais mecanismos de resistência aos carbapenêmicos descritos em *A. baumannii* são: inativação enzimática pela hidrólise do anel β -lactâmico, alterações nas proteínas ligadoras de penicilina (PBP), alterações de permeabilidade, principalmente perda de porina e atividade de bombas de efluxo, que promovem a diminuição da concentração do antimicrobiano no interior da célula (PEREZ *et al.*, 2007).

O sucesso das enzimas carbapenemases entre os isolados de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos é baseado no fato de que os genes codificadores

das mesmas estarem frequentemente associados a elementos genéticos móveis como plasmídeos, integrons e transposons. Assim, estas estruturas atuam como protagonistas na disseminação horizontal dessas enzimas entre diferentes linhagens da mesma espécie ou de espécies distintas (PEREZ *et al.*, 2007).

A. baumannii produz β -lactamases capazes de inativar penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos. Carbapenemases do tipo KPC, classe A de Ambler, são codificadas por plasmídeos e foram descritas inicialmente em isolados de *Klebsiella pneumoniae*, daí a denominação “KPC”. Há relatos de outras espécies de enterobactérias produtoras de KPC, como *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. No entanto, são raros os relatos de achados clínicos de *A. baumannii* produtor de KPC (OLIVER, 2004). Entretanto, estudo recente detectou o gene *bla*_{KPC} nesta bactéria, obtido de espécimes clínicos distintos, de pacientes em hospitais de Porto Rico (ROBLEDO *et al.*, 2010). Este tipo de enzima confere resistência a todos os β -lactâmicos, mas raramente são inibidas pelo ácido clavulânico.

Outras enzimas já foram descritas em *A. baumannii*, como VEB, SHV e CTX-m. Porém, estas β -lactamases não são capazes de hidrolizar carbapenêmicos (PEREZ *et al.*, 2007).

As MBL (classe B de Ambler) constituem carbapenemases de grande importância epidemiológica, considerando seu caráter emergente no que se refere à resistência aos β -lactâmicos. Os genes codificadores destas enzimas encontram-se presentes em plasmídeos ou integrons. Apresentam habilidade de hidrolizar todos os β -lactâmicos, com exceção do aztreonam e requerem o elemento zinco como cofator para exercer atividade, e por isso, são inibidas por compostos quelantes de cátions bivalentes, como EDTA (OLIVER, 2004).

Atualmente são reconhecidas seis classes de MBL de interesse clínico: IMP, VIM, SPM, GIM, SIM e NDM. A primeira MBL a ser caracterizada foi IMP-1, em *Pseudomonas aeruginosa*, no Japão em 1988. Atualmente estas enzimas têm sido descritas não somente em *Pseudomonas aeruginosa*, mas também em outras espécies da família *Enterobacteriaceae* e *A. baumannii* (WALSH, 2005; FALLAH *et al.*, 2011).

Há relatos de variantes de MBL em *A. baumannii* em diversas áreas geográficas, como IMP-1 na Itália, Brasil, Japão, Irã e Coreia do Sul; IMP-2 na Itália e no Japão; IMP-4 em Hong Kong; IMP-5 em Portugal; IMP-6 no Brasil e IMP-11 no Japão (POIREL e NORDMAN, 2006; TOGNIM *et al.*, 2006; PEYMANI *et al.*, 2011).

VIM-2 no Irã e na Coréia e SIM-1 na Coréia (LEE *et al.*, 2005; PEYMANI *et al.*, 2011).

Embora pouco frequente, *A. baumannii* produtor de NDM tem sido isolado de alguns países como Alemanha, China e Egito (CHEN *et al.*, 2011; KAASE *et al.*, 2011; PFEIFER *et al.*, 2011). No Brasil, os achados de NDM foram restritos a enterobactérias, como *Enterobacter cloacae*, *Morganella morganii* e *Providencia retgeri* (CARVALHO-ASSEF *et al.*, 2013; ROZALES *et al.*, 2014).

As cefalosporinases do tipo AmpC (classe C de Ambler) de origem cromossomal estão presentes em *A. baumannii*, o que lhes confere resistência a penicilinas, cefalosporinas de reduzido e amplo espectro, com exceção de cefepime e carbapenêmicos, que permanecem sensíveis (PEREZ *et al.*, 2007).

Carbapenemases do tipo oxacilinases (classe D de Ambler) hidrolisam oxacilina mais eficientemente que benzilpenicilina, além das outras penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos. A atividade das oxacilinases frente aos carbapenêmicos é menos efetiva que as MBL (POIREL e NORDMAN, 2006). Embora identificados primeiramente em plasmídeos, tem sido demonstrado que muitas espécies de bactérias Gram negativas possuem naturalmente em seus genomas genes que codificam estas oxacilinases (POIREL *et al.*, 2010).

Mais de 250 tipos de oxacilinases já foram descritos, os quais apresentam grande variedade nas propriedades bioquímicas e no espectro de ação. Enquanto algumas oxacilinases são capazes de hidrolisar penicilinas e cefalosporinas de primeira e segunda geração, outras são capazes de hidrolisar cefalosporinas de terceira a quarta geração e outras apresentam atividade hidrolítica frente aos carbapenêmicos (PICÃO *et al.*, 2009).

Avaliando a identidade entre as sequências de aminoácidos das variantes de OXA's é possível caracterizar cinco subgrupos já descritos em *A. baumannii*: OXA-23-like (OXA-23, OXA-27, OXA-49 e OXA-73), OXA-24-like (OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-40 e OXA-72), OXA-51-like (OXA-51, OXA-65, OXA-69, OXA-68), OXA-58-like (OXA-58, OXA-96 e OXA-97) e OXA-143-like (PELEG *et al.*, 2008; HIGGINS *et al.*, 2009; POIREL *et al.*, 2010).

Todos estes grupos estão relacionados com resistência adquirida aos carbapenêmicos, com exceção de OXA-51-like, que é composto por enzimas intrínsecas em *A. baumannii*, e essa condição é muito empregada para caracterização taxonômica desta espécie. Enzimas OXA-51-like apresentam

importância na resistência aos carbapenêmicos quando possuem o elemento de inserção *IsAba1* junto ao gene codificador desta enzima, ocorrendo a hiperexpressão e contribuindo assim para o fenótipo de menor susceptibilidade a este tipo de antimicrobiano (TURTON *et al.*, 2006; CHAULAGAIN *et al.*, 2012).

OXA-23 foi descrito pela primeira vez na Escócia em 1985. Desde a última década, essa enzima tem sido detectada em vários países, como Tunísia, Bulgária, Turquia, Itália, Portugal e Brasil (MANSOUR *et al.*, 2008; STOEVA *et al.*, 2008; ANSALDI *et al.*, 2011; GARLANREZEC *et al.*, 2011; CHAGAS *et al.*, 2014)

No Brasil, a resistência aos carbapenêmicos em isolados clínicos de *A. baumannii* mediada por enzimas do tipo OXA é a mais prevalente (CHAGAS *et al.*, 2014). *A. baumannii* produtor de OXA-23 é o mais freqüente, tendo sido relatado em diversos estados, como São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Santa Catarina (CARVALHO *et al.*, 2009; SCHIMITH-BIER *et al.*, 2010; MEDEIROS e LINCOPAN, 2013).

Embora a síntese de enzimas seja o mecanismo molecular de resistência aos carbapenêmicos mais comum em espécies de *Acinetobacter*, outros mecanismos também podem estar associados (PEREZ *et al.*, 2007; CARVALHO *et al.*, 2009; SCHIMITH-BIER *et al.*, 2010; MEDEIROS e LINCOPAN, 2013).

Assim, compreender a contribuição dos canais de porinas para a resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii* permanece um desafio. Estudos apontam a presença de isolados com reduzida expressão de proteínas de membrana com 37, 44 e 47 kDa e aumento da expressão de cefalosporinases de classe C contribuindo para o fenótipo de resistência aos carbapenêmicos (PEREZ *et al.*, 2007).

Bombas ou sistemas de efluxo representam um fenômeno único de resistência simultânea a várias classes diferentes de antimicrobianos. Essas bombas medeiam a expulsão de componentes tóxicos para a célula bacteriana, incluindo antimicrobianos. Distintas famílias de bombas de efluxo presentes em várias espécies bacterianas têm sido identificadas. Considerando *A. baumannii*, a principal bomba de efluxo é AdeABC, que confere resistência aos aminoglicosídeos, tetraciclinas, eritromicina, cloranfenicol, beta-lactâmicos, fluoroquinolonas, trimetropim e brometo de etídio. A hiperexpressão de AdeABC também pode conferir alto nível de resistência aos carbapenêmicos, em especial se em conjunto com a produção de oxacilinases (VILA, MARTÍ e CÉSPDES, 2007; PEREZ *et al.*, 2007).

A resistência de *A. baumannii* aos carbapenêmicos é também explicada pela reduzida expressão de PBP-2, como foi descrito em pesquisa realizada na Espanha. Estas amostras apresentaram perda de PBP-2 e produção de beta-lactamase, ilustrando a interação entre vários mecanismos distintos de resistência contra uma única classe de antimicrobiano (FERNANDEZ-CUENCA, 2003)

A detecção rápida e efetiva de isolados de *A. baumannii* multirresistente é crucial para o estabelecimento da terapia antimicrobiana apropriada, além de contribuir para prevenir a disseminação destas linhagens nos hospitais.

Poucas são as opções terapêuticas para o tratamento de infecções nosocomiais por *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos. Polimixinas (B e E/colistina) e tigeciclina têm sido as drogas de escolha (KARAH *et al.*, 2012). Entretanto, achados laboratoriais de resistência a estes antimicrobianos já têm sido relatados (PEREZ *et al.*, 2010; MOHAMED e RAAFAT, 2011).

2.5 *Pseudomonas aeruginosa*

O gênero *Pseudomonas* é caracterizado por bacilos Gram negativos, retos ou levemente curvos, aeróbios estritos, móveis por meio de flagelos, não fermentam a glicose e produzem pigmentos hidrossolúveis, capazes de se difundirem nos meios de cultura (HILL, HENRY e SPEERT, 2007). Este gênero compreende um grande número de espécies, aproximadamente 213, sendo *P. aeruginosa* a principal de interesse clínico e também um dos mais importantes patógenos causadores de IH (EUZÉBY, 2014).

P. aeruginosa encontra-se amplamente distribuída na natureza e no ambiente hospitalar. Apresenta necessidades nutricionais mínimas, além de tolerância a condições físicas variadas (temperatura e pH), o que favorece sua sobrevivência em superfícies por períodos prolongados. Podem estar presentes em alimentos (especialmente frutas e vegetais frescos) e colonizar a pele de seres humanos saudáveis e outros sítios úmidos do corpo, incluindo orofaringe, mucosa nasal, axilas e períneo (HOUANG *et al.*, 2001; KARLOWSKY *et al.*, 2003).

As características fenotípicas empregadas para a identificação laboratorial desta espécie bacteriana são baseadas em aspectos morfológicos da célula, tipo de flagelo, utilização de carbono como ácidos orgânicos, polialcóis e aminoácidos,

capacidade de crescimento em diferentes condições, resistência a alguns antimicrobianos e produção de enzimas extracelulares (PEIX, RAMÍREZ-BAHENA, VELÁZQUEZ, 2009).

As infecções hospitalares causadas por *P. aeruginosa* geralmente envolvem trato respiratório e urinário, feridas, pneumonia, cateteres e até mesmo sepse. Os principais fatores predisponentes a estas infecções são: permanência prolongada em unidades de terapia intensiva, procedimentos invasivos, uso extensivo de antimicrobianos, em especial fluoroquinolonas, e existência de doenças de base (PEÑA *et al.*, 2009).

Inúmeros fatores de virulência estão presentes em linhagens de *P. aeruginosa*, como fímbrias ou pilli, flagelos (altamente imunogênicos) (KIPNIS, SAWA e WIENER-KRONISH, 2006), exopolissacarídeo (EPS), importante da patogênese dos quadros de fibrose cística, habilidade de formação de biofilmes em superfícies, contribuindo para cronicidade dos processos infecciosos (HENTZER *et al.*, 2001), além da síntese de fatores de virulência extracelulares, como elastases, protease alcalina, fosfolipase C e hemolisinas (JAFFAR-BANDJER *et al.*, 1995).

Os carbapenêmicos têm sido antimicrobianos de escolha para o tratamento de IH causadas por bacilos Gram negativos devido ao amplo de espectro de ação e à sua grande estabilidade frente à maioria das beta-lactamases. Entretanto, tem se tornado frequente o relato de *Pseudomonas aeruginosa* com susceptibilidade reduzida frente a estas drogas (NEVES *et al.*, 2011; MIYAWAKI *et al.*, 2012).

O aumento da frequência de IH por *Pseudomonas aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos compromete muito a seleção da adequada terapia a ser instituída, favorecendo ao aumento significativo das taxas de morbidade e mortalidade (NEVES *et al.*, 2011). Geralmente, essas infecções são de difícil tratamento, devido à resistência natural desta espécie a vários antimicrobianos, bem como sua habilidade em adquirir mecanismos adicionais de resistência a diversas classes de antimicrobianos e saneantes (BONOMO e TOLMASKY, 2007).

P. aeruginosa é intrinsecamente resistente a vários agentes antimicrobianos, em virtude da baixa permeabilidade de membrana, expressão constitutiva de várias bombas de efluxo com substratos específicos e ocorrência natural de β -lactamases do tipo AmpC cromossomal (LIVERMORE, 2001; MESAROS *et al.*, 2007). O espectro de resistência natural desta bactéria inclui penicilina G, aminopenicilinas e

suas associações com inibidores de β -lactamases, além de cefalosporinas de primeira e segunda geração (STRATEVA e YORDANOV, 2009; CLSI, 2014).

A perda de sensibilidade das linhagens de *P. aeruginosa* aos carbapenêmicos pode ser decorrente da perda de porinas (canais localizados na membrana externa que permitem a difusão passiva de solutos hidrossolúveis), presença de PBP com baixa afinidade por estas drogas, superexpressão de bombas de efluxo e/ou hidrólise enzimática (TOMÁS *et al.*, 2010; NEVES *et al.*, 2011).

Em *P. aeruginosa*, diferentes porinas podem ser encontradas, cada qual com sua função, como OprC, OprD, OprE, OprF. A presença de OprD, também denominada porina D2, tem sido amplamente investigada, uma vez que a sua ausência ou mesmo a expressão reduzida do gene *oprD*, codificador desta porina, tem contribuído enormemente para a resistência aos carbapenêmicos (YOSHIHARA *et al.*, 1996; LIVERMORE, 2001). Fisiologicamente, a principal função da porina OprD é permitir a entrada de carbapenêmicos, ainda que não de outros beta-lactâmicos (YOSHIHARA *et al.*, 1996). No Brasil, trabalhos ressaltam a relevância de alterações na expressão de OprD no fenótipo de *P. aeruginosa* multirresistente (TOMÁS *et al.*, 2010; XAVIER *et al.*, 2010).

A maioria dos mecanismos de proteção bacteriana contra o ingresso indesejado de moléculas prejudiciais à célula é governada por um mecanismo de transporte ativo para o exterior da célula, por meio de um sistema denominado bomba de efluxo. A principal função das bombas de efluxo presentes em *P. aeruginosa* é exportar substâncias tóxicas ou metabólitos secundários, assim como a excreção de moléculas sinalizadoras que governam a comunicação celular. Os antimicrobianos estão entre estes compostos e a extrusão dos mesmos compromete de forma significativa a eficácia terapêutica (PEARSON *et al.*, 1999; NEVES *et al.*, 2011).

Entre as bombas de efluxo caracterizadas em *P. aeruginosa*, a expressão de quatro sistemas (MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN e MexXY-OprM) foi relatada entre isolados clínicos e relacionados com o fenótipo de resistência múltipla a drogas (QUALE *et al.*, 2006; CABOT *et al.*, 2011). Cada bomba de efluxo tem afinidade por um substrato antimicrobiano e as fluoroquinolonas são substratos universais para todas as bombas do tipo Mex (LLANES *et al.*, 2011).

As bombas de efluxo são codificadas por elementos genéticos localizados em cromossomos e também em plasmídeos, o que facilita a propagação destes

genes, contribuindo para resistência adquirida e intrínseca, respectivamente, permitindo a esta espécie de bactéria persistir em ambientes hostis, inclusive na presença de antimicrobianos e saneantes (POOLE, 2005).

Responsáveis pelos elevados índices de resistência aos carbapenêmicos no Brasil (aproximadamente 41,3%) as MBL's têm sido alvo de estudo em todo o mundo (MENDES *et al.*, 2005; SCHEFFER *et al.*, 2010). Com exceção do aztreonam, essas enzimas degradam todos os β -lactâmicos, incluindo as associações com inibidores de beta-lactamase, como tazobactam, clavulanato e sulbactam (NEVES *et al.*, 2011).

Em isolados de *P. aeruginosa* produtores de MBL no Brasil, tem sido relatada a presença de IMP e VIM. Porém, o principal problema se concentra em linhagens produtoras de SPM-1, que parecem ser endêmicas e responsáveis por altos níveis de mortalidade (GALES *et al.*, 2003; GASPARETO *et al.*, 2007; XAVIER *et al.*, 2010).

Embora constitua um achado raro no Brasil, há relatos de GIM e NDM-1 em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* em outros países (CASTANHEIRA *et al.*, 2004; JOVCIC *et al.*, 2011).

Mesmo sendo de ocorrência incomum, oxacilinases com atividade hidrolítica frente aos carbapenêmicos em isolados clínicos de *P. aeruginosa*, como OXA-23, OXA-40, OXA-48 e OXA-58 (MARTÍNEZ, POIREL e NORDMAN, 2009), a presença de variantes deste grupo com espectro de ação reduzido (não atuam sobre imipenem ou meropenem), como as de grupo I (OXA-5, OXA-7, OXA-10, OXA-13 e suas derivadas), II (OXA-2, OXA-3, OXA-15 e OXA-20), III (OXA-1, OXA-4, OXA-30 e OXA-31), IV (OXA-9) e V (LCR-1) tem sido reportada com frequência (SOROUR, WALI e EL-HODAKY, 2008).

Mesmo sem atividade hidrolítica frente aos carbapenêmicos, ESBL (beta-lactamase de espectro estendido), como CTX-m e GES, e AmpC cromossomal têm sido encontradas em linhagens de *P. aeruginosa* exibindo fenótipo de multirresistência, quando associadas a superexpressão de bombas de efluxo e/ou perda de porinas (TOMAS *et al.*, 2010; CABOT *et al.*, 2011).

Achados clínicos de *P. aeruginosa* produtores de carbapenemase do tipo KPC tem se tornado frequente em diversos países como China, Colômbia e Estados Unidos (VILLEGAS *et al.*, 2007; GE *et al.*, 2011; POIREL *et al.*, 2011). No Brasil, há

relatos de *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de KPC-2 (ALMEIDA *et al.*, 2012).

Polimixinas têm sido apontadas como alternativas para combater infecções causadas por *P. aeruginosa* multirresistente (SARDELIC *et al.*, 2012). Entretanto, tais fármacos apresentam nefro e neurotoxicidades e podem apresentar resistência durante o tratamento, levando a falha terapêutica (RICE, 2006).

Logo, a correta identificação laboratorial a cerca do(s) fenômeno(s) responsável(eis) pelo fenótipo de resistência aos carbapenêmicos em bacilos Gram negativos, como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*, é uma urgência clínica e epidemiológica.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar características fisiológicas e moleculares relacionadas à virulência e resistência aos carbapenêmicos em *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*, isolados pelo serviço de microbiologia do Laboratório Côrtes Villela, situado num hospital terciário, na cidade de Juiz de Fora, Minas Gerais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar aspectos clínicos-epidemiológicos de infecções envolvendo *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos, entre os pacientes internados em um hospital terciário de Juiz de Fora - MG, nos anos de 2012 e 2013;
- Avaliar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos de isolados obtidos durante o ano de 2012 e a ocorrência de marcadores genéticos codificadores de oxacilinases dos tipos *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-58} e *bla*_{OXA-143};
- Isolar amostras de *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* de pacientes internados no mesmo hospital, durante o ano de 2013, e determinar seu perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas de interesse clínico-microbiológico;
- Avaliar características de virulência (atividade hemolítica, tolerância ao estresse oxidativo e aos biocidas de uso hospitalar, capacidade de formação de biofilme) nas bactérias isoladas resistentes ou não aos carbapenêmicos durante o ano de 2013;

- Pesquisar, por meio da técnica de PCR, genes associados à síntese de β -lactamases (*bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{GIM}, *bla*_{SIM}, *bla*_{SPM}, *ampC*), à expressão de sistemas de efluxo ativo (*adeB*, *mexB*, *mexD*, *mexF* e *mexY*) e perda de porina (*oprD*) nas linhagens bacterianas isoladas durante o ano de 2013, com fenótipo de resistência aos carbapenêmicos, obtidas de pacientes internados neste mesmo hospital;
- Estabelecer correlações entre a presença de marcadores genéticos relacionados à resistência aos carbapenêmicos e fatores de virulência nas linhagens bacterianas isoladas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Este é um estudo descritivo, observacional e transversal. Foram avaliados espécimes clínicos de pacientes hospitalizados, de ambos os sexos, independente da idade, atendidos por um serviço de microbiologia clínica em um hospital terciário, em Juiz de Fora, MG, nos anos de 2012 e 2013.

Este estudo encontra-se em conformidade com a legislação vigente sobre pesquisa científica envolvendo seres humanos (resolução CNS 196/96) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFJF (parecer 346/2011, protocolo 2587.327.2011) (Anexo 1).

O referido hospital é do tipo geral e conta com aproximadamente 120 leitos, incluindo unidade de terapia intensiva (adulto e neonatologia), unidade coronariana, enfermarias, centro cirúrgico e atendimento ambulatorial. Dispõe de serviços de clínicas especializadas e serviços de diagnóstico, com atendimento restrito à rede privada.

Os espécimes clínicos, obtidos para exames laboratoriais microbiológicos compreendendo cultura e antibiograma, de acordo com requisição médica, foram semeados em meios de cultura específicos, a saber: (i) urina em ágar Cled/BD-Difco; (ii) secreção traqueal em ágar Sangue e ágar MacConkey/BD-Difco; (iii) ponta de cateter e demais materiais biológicos em ágar Sangue e caldo Tioglicolato/BD-Difco). Todos os meios de cultura assim semeados foram incubados a 35°C por até 48 horas em estufa bacteriológica, conforme recomendações contidas em manual de padronização técnica para serviço de microbiologia clínica da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil (ANVISA, 2004).

Foram incluídos neste trabalho isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* resistentes ao imipenem e/ou meropenem, obtidos de diferentes materiais biológicos. Entretanto, foi considerada apenas uma amostra não replicada de cada bactéria por paciente. A amostragem foi realizada por conveniência, de forma aleatória (Figura 2).

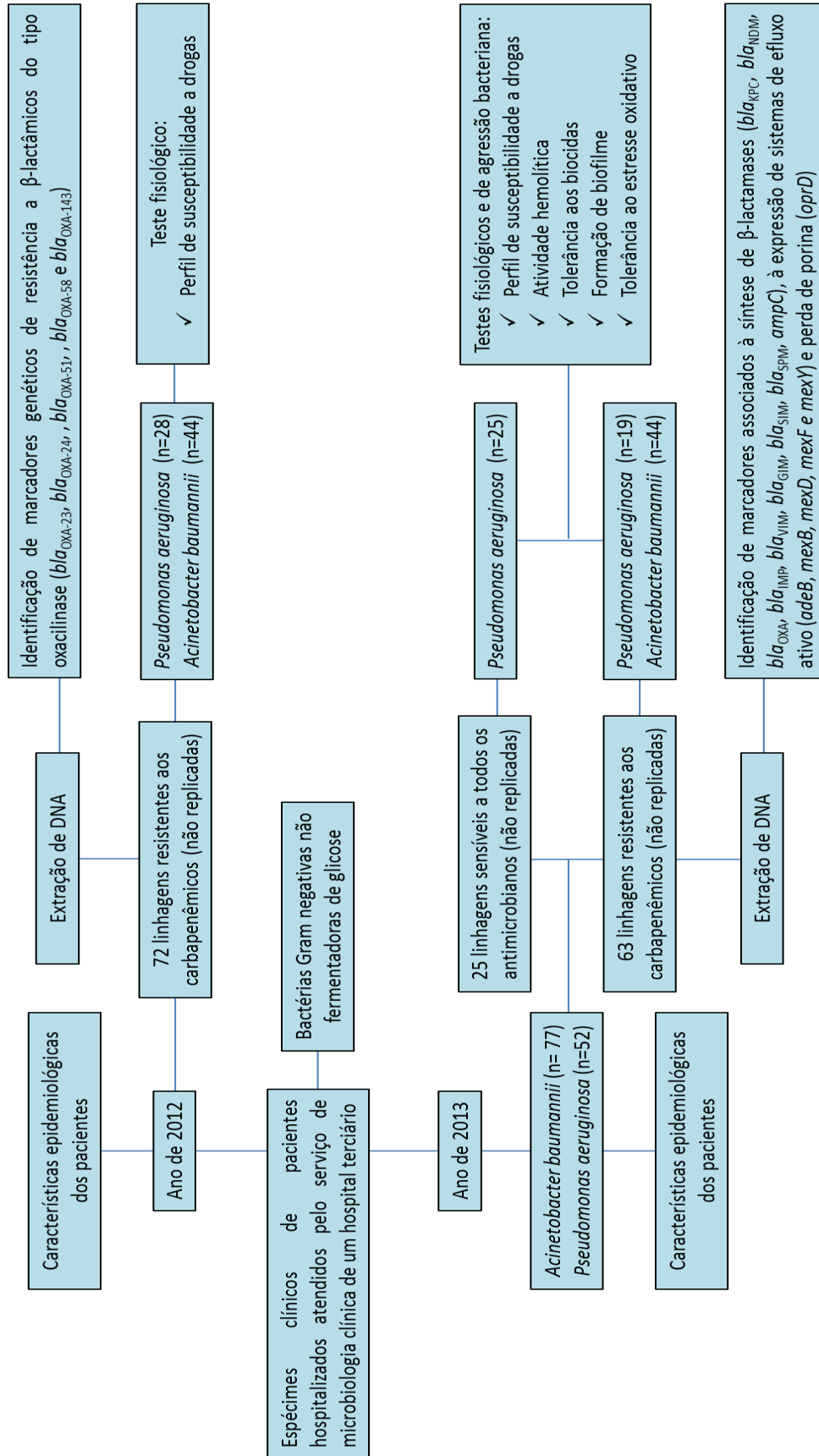


Figura 2. Delineamento experimental

4.2 IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA

Todas as espécies bacterianas isoladas foram identificadas pelo sistema Vitek 2 Compact[®] (BioMerieux/França), por meio do cartão GN, de acordo com as instruções do fabricante.

Para controle de qualidade, foram incluídas as amostras de referência *Enterobacter cloacae* ATCC 700323 e *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC 17666, conforme orientações do fabricante.

4.3. ESTUDO ANO 2012

4.3.1 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

As amostras bacterianas isoladas foram submetidas ao teste de susceptibilidade a drogas pelo método de disco-difusão, de acordo com protocolos do CLSI (2012), com exceção da avaliação da tigeciclina (JONES *et al.*, 2007).

Foram testadas drogas, como: amicacina (30µg), gentamicina (10µg), ciprofloxacina (5µg), piperacilina-tazobactam (100/10µg), ceftazidima (30µg), cefepime (30µg), meropenem (10µg) e imipenem (10µg) para *P. aeruginosa* e *Acinetobacter spp.* Discos de antimicrobianos adicionais de sulfazotrim (25µg), tetraciclina (30µg), ampicilina-sulbactam (10/10µg), tigeciclina (15µg) e polimixina B, foram testados contra *Acinetobacter spp.*, e aztreonam (30µg) para *P. aeruginosa*. Os discos de antimicrobianos utilizados foram obtidos comercialmente (Laborclin/Brasil, com exceção da tigeciclina: Oxoid/EUA). Tiras de E-test foram utilizadas para avaliar polimixina B (BioMerieux/França). As linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 35218 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foram utilizadas como amostras de referência no controle da qualidade para os discos de antimicrobianos utilizados, conforme recomendação dos protocolos do CLSI/2012.

As linhagens bacterianas de referência empregadas para fins de controle de qualidade foram mantidas congeladas a -20°C, em caldo TSB – Tryptic Soy Broth

(BD-Difco/Brasil) acrescido de glicerol 10% (Vetec/Brasil), de acordo com o Termo de Cooperação Técnica número 37 (ANVISA/2006).

4.3.2 EXTRAÇÃO DE DNA BACTERIANO

Para a obtenção de DNA genômico, as amostras bacterianas foram cultivadas em caldo TSB (BD-Difco/Brasil), por 24 horas, a 35°C. A seguir, 1 mL da cultura foi utilizado para extração de DNA genômico total, usando-se o kit *Wizard Genomic DNA Purification* (Promega Corporation/USA), de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação do DNA bacteriano extraído foi realizada por meio de espectrofotometria (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific, Wilmington – DE, USA) e visualização em gel de agarose 2% (Invitrogen/Brasil). O DNA foi estocado em freezer a –20°C, para posteriormente ser utilizado como DNA molde em PCR.

4.3.3 IDENTIFICAÇÃO DOS GENES *bla*_{OXA} ENTRE AS BACTÉRIAS RESISTENTES AOS CARBAPENÊMICOS POR PCR

As análises por PCR foram realizadas utilizando oligoiniciadores específicos para amplificação dos genes *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-58} e *bla*_{OXA-143} (Tabela 1). As reações foram realizadas em volumes de 25µL, contendo aproximadamente 10ng de DNA molde (1 µL), 12,5 µL de *Gotaq Green Master Mix* 2X (Promega Corporation/USA), 10 µM dos iniciadores (1 µL de cada iniciador) e 9,5 µL de água ultrapura. As condições de amplificação foram ajustadas de acordo com a literatura, e as reações realizadas em termociclador automatizado (Bioer Genepro/USA). Os amplicons esperados foram observados em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio. Como padrão de peso molecular, foi utilizado o marcador de 100 bp DNA ladder (Life Technologies Inc./EUA).

O controle negativo destes testes foi realizado a partir de reações sem DNA molde e como controle positivo, foram utilizadas amostras da coleção de culturas do Laboratório de Fisiologia e Genética Molecular Bacteriana para os marcadores *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-51} e *bla*_{OXA-143}. Para os demais genes pesquisados foram realizados ensaios de seqüenciamento de amplicons selecionados numa amostragem de 10%

das reações específicas de cada um dos marcadores. Para as reações do sequenciamento, foram utilizados os produtos de PCR de cada gene estudado em duas réplicas. As reações foram processadas em equipamento ABI 3730 DNA analyser (Applied Biosystems/USA).

Tabela 1: Oligoiniciadores utilizados neste estudo e tamanho dos fragmentos

Gene	Sequência	Amplicon (bp)	Referência
<i>bla_{KPC}</i>	5'-TGTCACTGTATCGCCGTC-3' 5'-CTCAGTGCTCTACAGAAAACC-3'	1011	Yigit <i>et al.</i> , 2001
<i>bla_{SPM-1}</i>	5'-CCT ACA ATC TAA CGG CGA CC-3' 5'-TCG CCG TGT CCA GGT ATA AC-3'	649	Gales <i>et al.</i> , 2003
<i>bla_{NDM-1}</i>	5'-GGT TTG GCG ATC TGG TTT TC-3' 5'-CGG AAT GGC TCA TCA CGA TC-3'	621	Nordmann <i>et al.</i> , 2011
<i>bla_{OXA-1}</i>	5'-AGC CGT TAA AAT TAA GCC C-3' 5'-CTT GAT TGA AGG GTT GGG CG-3'	908	Danel <i>et al.</i> , 1995
<i>bla_{OXA-2}</i>	5'-GCC AAA GGC ACG ATA GTT GT-3' 5'-GCG TCC GAG TTG ACT GCC GG-3'	701	De Champs <i>et al.</i> , 2002
<i>bla_{OXA-10}</i>	5'-TCT TTC GAG TAC GGC ATT AGC-3' 5'-CCA ATG ATG CCC TCA CTT TCC-3'	760	Naas <i>et al.</i> , 2000
<i>bla_{OXA-23}</i>	5'-GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA-3' 5'-ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT-3'	501	Woodford <i>et al.</i> , 2006
<i>bla_{OXA-24}</i>	5'-GGT TAG TTG GCC CCC TTA AA-3' 5'-AGT TGA GCG AAA AGG GGA TT-3'	246	Woodford <i>et al.</i> , 2006
<i>bla_{OXA-51}</i>	5'-TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG-3' 5'-TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG-3'	353	Woodford <i>et al.</i> , 2006
<i>bla_{OXA-58}</i>	5'-AAG TAT TGG GGC TTG TGC TG-3' 5'-CCC CTC TGC GCT CTA CAT AC-3'	599	Woodford <i>et al.</i> , 2006
<i>bla_{OXA-143}</i>	5'-TGG CAC TTT CAG CAG TTC CT-3' 5'-TAA TCT TGA GGG GGC CAA CC-3'	149	Higgins <i>et al.</i> , 2010
<i>bla_{IMP}</i>	5'-GGA ATA GAG TGG CTT AAY TCT C-3' 5'-CCA AAC YAC TAS GTT ATC T-3'	188	Ellington <i>et al.</i> , 2007
<i>bla_{VIM}</i>	5'-GAT GGT GTT TGG TCG CAT A-3' 5'-CGA ATG CGC AGC ACC AG-3'	390	Ellington <i>et al.</i> , 2007
<i>bla_{GIM}</i>	5'-TCG ACA CAC CTT GGT CTG AA-3' 5'-AAC TTC CAA CTT TGC CAT GC-3'	477	Ellington <i>et al.</i> , 2007
<i>bla_{SIM}</i>	5'-TAC AAG GGA TTC GGC ATC G-3' 5'-TAA TGG CCT GTT CCC ATG TG-3'	570	Ellington <i>et al.</i> , 2007
<i>mexB</i>	5'-GTG TTC GGC TCG CAG TAC TC-3' 5'-AAC CGT CGG GAT TGA CCT TG-3'	244	Yoneda <i>et al.</i> , 2005
<i>mexD</i>	5'-CGA GCG CTA TTC GCT GC-3' 5'-GGC AGT TGC ACG TCG A-3'	165	Xavier <i>et al.</i> , 2010
<i>mexF</i>	5'-CGC CTG GTC ACC GAG GAA GAG T-3' 5'-TAG TCC ATG GCT TGC GGG AAG C-3'	255	El Amin <i>et al.</i> , 2005
<i>mexY</i>	5'-CCG CTA CAA CGG CTA TCC CT-3' 5'-AGC GGG ATC GAC CAG CTT TC-3'	250	Yoneda <i>et al.</i> , 2005
<i>oprD</i>	5'-TCC GCA GGT AGC ACT CAG TTC-3' 5'-AAG CCG GAT TCA TAG GTG GTG-3'	191	Savli <i>et al.</i> , 2003
<i>ampC</i>	5'-CTG TTC GAG ATC GGC TC-3' 5'-CGG TAT AGG TCG CGA G-3'	166	Xavier <i>et al.</i> , 2010
<i>adeB</i>	5'-AAC GGA CGA CCA TCT TTG AGT ATT-3' 5'-CAG TGT TCC ATT TCA CGC AT-3'	90	Peleg <i>et al.</i> , 2007

4.3.4 REVISÃO DOS PRONTUÁRIOS DOS PACIENTES

Os prontuários médicos dos pacientes com isolados de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* resistentes aos carbapenêmicos foram avaliados.

Dados como idade, sexo, espécime clínico, unidade de internação e evolução clínica dos pacientes foram considerados.

Estas informações foram pesquisadas diretamente em prontuários eletrônicos, sendo utilizada planilha igualmente eletrônica para registro destes dados.

4.4 ESTUDO ANO 2013

4.4.1 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Para as amostras isoladas entre janeiro e dezembro de 2013, o perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas foi determinado de forma semi-quantitativa, pelo sistema Vitek 2 Compact® (BioMerieux/França), por meio do cartão N239, de acordo com as instruções do fabricante.

Foram testadas as seguintes drogas: amicacina, gentamicina, ciprofloxacina, colistina, piperacilina-tazobactam, ceftazidima, cefepime, ertapenem, meropenem, imipenem, ampicilina, ampicilina-sulbactam, cefoxitina, ceftriaxona, cefuroxima e tigeciclina.

Para controle de qualidade, foram incluídas as amostras de referência *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

As linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* (n=19) e *Acinetobacter baumannii* (n=44) resistentes aos carbapenêmicos foram mantidas em ágar Mueller Hinton (BD-Difco/Brasil) inclinado, em temperatura ambiente, para experimentos posteriores.

4.4.2 AVALIAÇÃO FISIOLÓGICA DE HABILIDADES BACTERIANAS ASSOCIADAS À AGRESSÃO

4.4.2.1 AVALIAÇÃO DA HABILIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILMES

A avaliação da habilidade de formação de biofilme pelas amostras foi realizada de acordo com a metodologia descrita por ANDRADE (2010). A partir de um pré-inóculo de cultura de 24 horas em caldo TSB (BD-Difco/Brasil) de todas as linhagens bacterianas, 400 µL de cultura foram utilizados para uma diluição em 4 mL de meio que, depois de homogeneizado, foram aplicados em poços de placas de poliestireno de 96 poços de fundo chato (200 µL).

As placas foram tampadas e incubadas em estufa bacteriológica por 24 horas, a 35°C. Após o período de crescimento, foi retirado o caldo de cultivo com o auxílio de uma pipeta esterilizada e os poços foram lavados com solução salina (NaCl 0,85%) esterilizada (Arboreto/Brasil). Foram adicionados 300 µL de metanol e as placas incubadas em temperatura ambiente por 15 minutos. Logo após, o metanol (Vetec/Brasil) foi removido e as placas deixadas destampadas em temperatura ambiente por 5 minutos, para evaporação de metanol residual. Em seguida, foram acrescentados 250 µL de cristal violeta (0,1%) (Newprov/Brasil) e as placas novamente incubadas em temperatura ambiente por 15 minutos. Após esse período, as placas foram lavadas com água destilada para retirar o excesso do corante não incorporado nas células bacterianas.

O corante incorporado foi extraído pela adição de 300 µL de uma solução de etanol/acetona (8:2) (Vetec/Brasil). O sistema foi deixado em repouso por 15 minutos tampado. Após este período, foi feita a leitura do corante solubilizado em leitor de placas (Thermo Scientific/Brasil) com filtro de 596nm. Assim, a absorbância foi equivalente à densidade de bactérias aderentes, e os resultados foram registrados como uma média de quatro réplicas.

As amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas, neste estudo, sensíveis a todos os antimicrobianos, recuperadas no mesmo período, foram utilizadas como controle negativo (n=25).

4.4.2.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA

A avaliação da atividade hemolítica foi realizada de acordo com metodologia descrita por QUIBLIER e colaboradores (2011). Suspensão bacteriana compatível

com escala de 0,5 MacFarland de cada isolado bacteriano a ser testado foi transferida com auxílio de uma micropipeta automática, em um volume de 250 μ L, para replicador de Steers. As amostras foram carimbadas na superfície de placas contendo ágar (BD-Difco/Brasil) suplementado com 5% de sangue de carneiro (Agar sangue) (Ebefarma/Brasil), com o replicador de Steers. As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas.

A observação de uma zona clara ou esverdeada ao redor do crescimento bacteriano indica β e α - hemólise, respectivamente. Ausência de halo representa ausência de hemólise e, conseqüentemente, ausência de atividade hemolítica.

Os testes foram realizados em duplicata. As amostras de *P. aeruginosa* isoladas sensíveis a todos os antimicrobianos, isoladas no mesmo período, foram utilizadas como controle negativo (n=25).

4.4.2.3 AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA AO ESTRESSE OXIDATIVO

O estudo da tolerância ao estresse oxidativo foi avaliado segundo metodologia proposta por SANTOS (2009). Pré-inóculos bacterianos foram obtidos em caldo TSB (BD-Difco/Brasil) (3mL) após serem cultivados por 24 horas, a 35°C. As culturas foram centrifugadas (6.000 x g, 10min) em condições assépticas, e a massa celular lavada 3x em salina tamponada, para a remoção de resíduos do meio de cultura. Em seguida, as massas celulares foram suspensas em salina e a concentração bacteriana ajustada para 10⁸ UFC/mL (escala de MacFarland 0,5).

As suspensões bacterianas foram uniformemente espalhadas sobre a superfície de placas contendo ágar Mueller Hinton (BD-Difco/Brasil), com o auxílio de um swab. Na seqüência, um disco de papel filtro padronizado (Cecon/Brasil) foi disposto no centro de cada placa e inoculado com 5 μ L de solução de peróxido de hidrogênio 30%. Após 24 horas de crescimento a 35°C, os halos de inibição gerados em torno dos discos de papel foram medidos.

Os testes foram realizados em duplicata. As amostras de *P. aeruginosa* isoladas sensíveis a todos os antimicrobianos, isoladas no mesmo período, foram utilizadas como controle negativo (n=25).

4.4.2.4 AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA AOS BIOCIDAS

O estudo da tolerância aos biocidas foi realizado através de adaptação da metodologia da técnica disco-difusão, preconizada pelo CLSI (2014).

Inóculo de cada amostra bacteriana estudada foi obtido seguindo o padrão de turbidez 0,5 da escala de MacFarland. As suspensões bacterianas foram uniformemente espalhadas sobre a superfície de placas contendo ágar Mueller Hinton (BD-Difco/Brasil), com o auxílio de um swab. Na seqüência, um disco de papel filtro padronizado (Cecon/Brasil) foi disposto no centro de cada placa e inoculado com 5µL de solução de hipoclorito de sódio 1%, 1,5%, 2% (Start/Brasil), solução de álcool 70% (Ciclo farma/Brasil), quaternário de amônio (Diversey/Brasil), sabão antisséptico (triclosan 0,5%) (Premisse/Brasil) e peróxido de hidrogênio 4,25% (Diversey/Brasil), diluído 1:16, conforme instrução de uso do fabricante. Após 24 horas, de crescimento a 35°C, os halos de inibição gerados em torno dos discos de papel foram medidos.

Os testes foram realizados em duplicata. As amostras de *P. aeruginosa* isoladas sensíveis a todos os antimicrobianos, isoladas no mesmo período, foram utilizadas como controle negativo (n=25).

4.5 EXTRAÇÃO DE DNA BACTERIANO

Para a obtenção de DNA genômico, as amostras bacterianas foram cultivadas em caldo TSB – Tryptic Soy Broth (BD-Difco/Brasil), por 24 horas, a 35°C. A seguir, 1 mL da cultura foi utilizado para extração de DNA genômico total, usando-se o kit *Wizard Genomic DNA Purification* (Promega Corporation/USA), de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação do DNA bacteriano extraído foi realizada por meio de espectrofotometria (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific, Wilmington – DE, USA) e visualização em gel de agarose 2% (Invitrogen/Brasil). O DNA foi estocado em freezer a -20°C, para posteriormente ser utilizado como DNA molde em PCR.

4.6 IDENTIFICAÇÃO DOS MARCADORES GENÉTICOS POR PCR

As análises por PCR foram realizadas utilizando oligoiniciadores específicos para amplificação de genes que codificam enzimas β -lactamases, bombas de efluxo e porina (Tabela 1). As reações foram realizadas em volumes de 25 μ L, contendo aproximadamente 10ng de DNA molde (1 μ L), 12,5 μ L de *Gotaq Green Master Mix* 2X (Promega Corporation/USA), 10 μ M dos iniciadores (1 μ L de cada iniciador) e 9,5 μ L de água ultrapura. As condições de amplificação foram ajustadas de acordo com a literatura, e as reações realizadas em termociclador automatizado (Bioer Genepro/USA). Os amplicons esperados foram observados em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio. Como padrão de peso molecular, foi utilizado o marcador de 100 bp DNA ladder (Life Technologies Inc./EUA).

O controle negativo destes testes foi realizado a partir de reações sem DNA molde e como controle positivo, foram utilizadas amostras da coleção de culturas do Laboratório de Fisiologia e Genética Molecular Bacteriana para os marcadores *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-143}, *bla*_{KPC}, *bla*_{SPM-1} e *bla*_{VIM}. Para os demais genes pesquisados foram realizados ensaios de sequenciamento de amplicons selecionados numa amostragem de 10% das reações específicas de cada um dos marcadores. Para as reações do sequenciamento, foram utilizados os produtos de PCR de cada gene estudado em duas réplicas. As reações foram processadas em equipamento ABI 3730 DNA analyser (Applied Biosystems/USA).

4.7 REVISÃO DOS PRONTUÁRIOS DOS PACIENTES

Os prontuários médicos dos pacientes com isolados de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* resistentes aos carbapenêmicos foram avaliados.

Variáveis como idade, sexo, espécime clínico, tempo (em dias) de hospitalização antes do isolamento do(s) microrganismo(s) estudado(s), uso prévio de antimicrobianos e de dispositivos médicos invasivos (cateter venoso, sonda vesical, traqueostomia, ventilação mecânica), motivo da internação (traumatismo,

complicação clínica, neurológica ou cirúrgica), duração (em dias) da internação e taxa de mortalidade intra-hospitalar associada à infecção ou colonização por estas bactérias foram consideradas.

Estas informações foram pesquisadas diretamente em prontuários eletrônicos, sendo utilizada planilha igualmente eletrônica para registro destes dados.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizado, teste *t* de Student (Excel 2013/Microsoft®), para comparação entre médias da capacidade de formação de biofilme, tolerância ao estresse oxidativo e à ação de biocidas, considerando-se valores de $p \leq 0,05$ para as análises.

A análise da correlação entre a resistência aos carbapenêmicos e a presença de fatores de virulência entre os microrganismos estudados, foi avaliada calculando-se *Odds ratio* (OR) (DJRHutchon®) (BLAND e ALTMAN, 2000).

5 RESULTADOS

5.1 ESTUDO ANO 2012

Durante o período estudado, foram isoladas 183 amostras de *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* a partir de urina, sangue, secreção traqueal e catéter. Das bactérias isoladas, 44 amostras de *A. baumannii* e 28 de *P. aeruginosa* foram resistentes aos carbapenêmicos, oriundas de 72 pacientes, distribuídos da seguinte forma, de acordo com a sua unidade de internação: CTI (n=42; 58,4%), enfermaria (n=17; 23,6%), unidade coronariana (n=12; 16,6%) e UTI neonatal (n=1; 1,4%). Os dados epidemiológicos, amostras clínicas e taxa de mortalidade intra-hospitalar associada à colonização e/ou infecção por *A. baumannii* e *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos estão apresentados na tabela 2.

Considerando os pacientes com quadro infeccioso associado a *Acinetobacter*, a idade média foi de 69,6 anos (intervalo de 11 dias a 96 anos de idade); 21 (47,7%) amostras bacterianas foram isoladas de pacientes do sexo feminino, enquanto 23 (52,3%) foram isoladas de indivíduos do sexo masculino. Pacientes com quadro infeccioso por *Pseudomonas* apresentaram idade média de 71,7 anos (intervalo de 30 a 92 anos). Vinte (71,5%) linhagens bacterianas foram isoladas de pacientes do sexo feminino e 8 (28,5%) de indivíduos do sexo masculino.

No período avaliado, as principais amostras clínicas encaminhadas para cultura microbiológica foram aspirado traqueal, seguido de urina e cateter. A taxa de mortalidade intra-hospitalar dos pacientes foi expressiva, sendo responsável por 77,2% e 78,5%, respectivamente, dos casos associados à colonização e/ou infecção por *Acinetobacter* e *Pseudomonas*.

Tabela 2: Aspectos clínicos-epidemiológicos dos pacientes com quadro infeccioso por *A. baumannii* e/ou *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos, hospitalizados entre janeiro e dezembro de 2012

Parâmetros epidemiológicos	Bactérias resistentes aos carbapenêmicos	
	<i>A. baumannii</i> (n=44)	<i>P. aeruginosa</i> (n=28)
Sexo: n (%)		
Masculino	23 (52,3)	8 (28,5)
Feminino	21 (47,7)	20 (71,5)
Idade: n (%)		
0-20 anos	1 (2,2)	0 (0)
21-40 anos	3 (6,8)	2 (7,1)
41-60 anos	6 (13,6)	3 (10,7)
> 61 anos	34 (77,4)	23 (82,1)
Espécimes clínicos: n (%)		
Urina	5 (9,20)	13 (31,7)
Sangue	5 (9,2)	2 (4,8)
Secreção traqueal	34 (63,2)	17 (41,6)
Ponta de cateter	7 (13)	6 (14,6)
Lavado broncoalveolar	1 (1,8)	0 (0)
Úlcera	1 (1,8)	2 (4,8)
Secreção abdominal	1 (1,8)	0 (0)
Implantes ortopédicos	0 (0)	1 (2,5)
Unidade de internação: n (%)		
Enfermaria	6 (13,6)	11 (39,3)
UTI	30 (68,2)	12 (42,9)
UC	7 (16,0)	5 (17,8)
UTI-Neo	1 (2,2)	0 (0)
Evolução do paciente: n (%)		
Alta	10 (22,8)	6 (21,5)
Óbito intra-hospitalar	34 (77,2)	22 (78,5)

Todas as amostras bacterianas estudadas (n=72) foram resistentes à ceftazidima, cefepime, imipenem e meropenem. Com relação às linhagens de *Acinetobacter* (n=44), resistência também foi observada para ciprofloxacina (n=44;

100%), piperacilina-tazobactam (n=44; 100%), gentamicina (n= 39; 88,7%), ampicilina-sulbactam (n=37; 84,1%), amicacina (n= 34; 77,3%), tetraciclina (n=19; 56,8%) e sulfazotrim (n=19; 56,8%). Em *Pseudomonas* (n=28), resistência também foi observada para ciprofloxacina (n=26; 92,8%), aztreonam (n=26; 92,8%), amicacina (n=18; 64,2%), piperacilina-tazobactam (n=13; 46,%) e gentamicina (n=6; 21,5%). Resistência a tigeciclina e polimixina B não foi observada em *Acinetobacter*. *Pseudomonas* não exibiu resistência, *in vitro*, à polimixina B (Tabela 3).

Tabela 3: Perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas entre os isolados de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos, durante o ano de 2012

Antimicrobianos	<i>A. baumannii</i> (n=44)		<i>P. aeruginosa</i> (n=28)	
	R (%)	S (%)	R (%)	S (%)
Imipenem	100	0	100	0
Meropenem	100	0	100	0
Ampicilina-sulbactam *	84,1	15,9	-	-
Piperacilina-tazobactam	100	0	46,4	53,6
Ceftazidima	100	0	100	0
Cefepime	100	0	100	0
Aztreonam *	-	-	92,8	7,2
Amicacina	77,3	22,7	64,2	35,8
Gentamicina	88,7	11,3	21,5	78,5
Tetraciclina *	56,8	43,2	-	-
Sulfazotrim *	56,8	43,2	-	-
Ciprofloxacina	100	0	92,8	7,2
Tigeciclina *	0	100	-	-
Polimixina B	0	100	0	100

* Drogas antimicrobianas não testadas contra ambas espécies bacterianas, considerando resistência intrínseca; R: resistência, incluindo resistência intermediária; S: sensibilidade

Pelo menos um dos marcadores genéticos relacionados com a síntese de oxacilinases (*bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-51} ou *bla*_{OXA-143}) foi detectado em todas as linhagens de

Acinetobacter avaliadas em 2012: bla_{OXA-23} (n=25; 56,8%), bla_{OXA-51} (n=40; 91%) e $bla_{OXA-143}$ (n=19; 43,2%). O genótipo $bla_{OXA-23}^{+}/bla_{OXA-51}^{+}$ foi o mais frequente (45,5%), seguido por $bla_{OXA-51}^{+}/bla_{OXA-143}^{+}$, observado em 41% das amostras bacterianas. Foi observado o genótipo bla_{OXA-23}^{+} em 9% das bactérias isoladas. Os marcadores genéticos bla_{OXA-24} e bla_{OXA-58} não foram detectados em nenhuma das amostras de *Acinetobacter*. Em relação aos isolados de *P. aeruginosa*, nenhum dos marcadores genéticos pesquisados foram encontrados (Tabela 4).

Tabela 4. Características fenotípicas e genotípicas de *A.baumannii* e *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos isolados de pacientes hospitalizados entre janeiro e dezembro de 2012

Bactéria	Fenótipo de resistência	Genótipo (genes <i>bla</i> _{OXA})	Origem dos isolados	
			Unidade (n; %)	Mês (n)
<i>A. baumannii</i> (n=44)	MP,IP,TZ,PM,AK,GM,CP,PT,TS	<i>bla</i> _{OXA-23}	UTI (1; 2,2)	NOV (1)
	MP,IP,TZ,PM,AK,GM,CP,PT,TS,TE	<i>bla</i> _{OXA-23}	UTI (1; 2,2)	NOV (1)
	MP,IP,TZ,PM,GM,CP,PT,AB,TS,TE	<i>bla</i> _{OXA-23}	UTI (1; 2,2)	DEZ (1)
	MP,IP,TZ,PM,AK,GM,CP,PT,AB,TS,TE	<i>bla</i> _{OXA-23}	ENFM (1; 2,2)	DEZ (1)
	MP,IP,TZ,PM,AK,GM, CP, PT, AB,TS,TE	<i>bla</i> _{OXA-51}	UTI (1; 2,2)	FEB (1)
	MP,IP,TZ,PM,CP,PT,AB	<i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-51}	ENFM (1; 2,2)	ABR (1)
	MP,IP,TZ,PM,AK,CP,PT,AB	<i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-51}	UTI (1; 2,2)	NOV (1)
	MP,IP,TZ,PM,GM,CP,PT,AB	<i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-51}	UTI (1; 2,2)	ABR (1)
	MP,IP,TZ,PM,GM,CP,PT,TS	<i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-51}	UTI (1; 2,2)	DEZ (1)
	MP,IP,TZ,PM,AK,GM,CP,PT,TS	<i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-51}	UTI (2; 4,54)	JUN (1) AGO (1)
	MP,IP,TZ,PM,AK,GM,CP,PT,AB	<i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-51}	UTI (2; 4,54)	FEB (1) ABR (1)
	MP,IP,TZ,PM,AK,CP,PT,AB,TS	<i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-51}	UC (1; 2,2)	MAR (1)
	MP,IP,TZ,PM,CP,PT,AB,TS,TE	<i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-51}	UC (1; 2,2)	JUN (1)
	MP,IP,TZ,PM,CP,PT,AB,TS,TE	<i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-51}	ENFM (1; 2,2)	MAR (1)
MP,IP,TZ,PM,AK,GM,CP,PT,TS,TE	<i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-51}	UTI-N (1; 2,2)	SET (1)	

	MP,IP,TZ,PM,AK,GM,CP,PT,AB,TS	<i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-51}	ENFM (1; 2,2)	ABR (1)
	MP,IP,TZ,PM,AK,GM,CP,PT,AB,TS	<i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-51}	UTI (5; 11,36)	ABR (1) MAI (1) JUL (1) SET (1) OUT (1)
	MP,IP,TZ,PM,AK,GM,CP,PT,AB,TS,TE	<i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-51}	UC (2; 4,54)	MAR (2)
	MP,IP,TZ,PM,CP,PT	<i>bla</i> _{OXA-51} , <i>bla</i> _{OXA-143}	UTI (1; 2,2)	DEZ (1)
	MP,IP,TZ,PM,CP,PT,AB	<i>bla</i> _{OXA-51} , <i>bla</i> _{OXA-143}	UC (1; 2,2)	OUT (1)
	MP,IP,TZ,PM,AK,CP,PT,AB	<i>bla</i> _{OXA-51} , <i>bla</i> _{OXA-143}	UTI (1; 2,2)	OUT (1)
	MP,IP,TZ,PM,AK,GM,CP,PT,AB	<i>bla</i> _{OXA-51} , <i>bla</i> _{OXA-143}	ENFF (1; 2,2)	JUL (1)
	MP,IP,TZ,PM,AK,GM,CP,PT,AB	<i>bla</i> _{OXA-51} , <i>bla</i> _{OXA-143}	UC (2; 4,54)	JUL (2) JUL (4)
	MP,IP,TZ,PM,AK,GM,CP,PT,AB	<i>bla</i> _{OXA-51} , <i>bla</i> _{OXA-143}	UTI (9; 20,45)	AGO (1) SET (2) OUT (2)
	MP,IP,TZ,PM,AK,GM,CP,PT,AB,TE	<i>bla</i> _{OXA-51} , <i>bla</i> _{OXA-143}	ENFF (1; 2,2)	NOV (1)
	MP,IP,TZ,PM,AK,GM,CP,PT,AB,TS	<i>bla</i> _{OXA-51} , <i>bla</i> _{OXA-143}	UTI (1; 2,2)	ABR (1)
	MP,IP,TZ,PM,AK,GM,CP,PT,AB,TS,TE	<i>bla</i> _{OXA-51} , <i>bla</i> _{OXA-143}	UTI (1; 2,2)	OUT (1)
	MP,IP,TZ,PM,AK,GM,CP,PT,AB	<i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-51} , <i>bla</i> _{OXA-143}	UTI (1; 2,2)	AGO (1)
<i>P. aeruginosa</i> (n=28)	MP,IP,TZ,PM	<i>Nd</i> *	UTI (1; 3,57)	MAI (1)
	MP,IP,TZ,PM,AT	<i>Nd</i> *	ENFF (1; 3,57)	MAI (1)
	MP,IP,TZ,PM,CP,AT	<i>Nd</i> *	ENFF (1; 3,57)	AGO (1)

	MP,IP,TZ,PM,GM,CP	<i>Nd*</i>	UTI (1; 3,57)	JUN (1)
	MP,IP,TZ,PM,PT,AT	<i>Nd*</i>	UTI (1; 3,57)	ABR (1)
	MP,IP,TZ,PM,CP,PT,AT	<i>Nd*</i>	ENFM (1; 3,57) ENFF (1; 3,57)	SET (1) OUT (1) ABR (1)
	MP,IP,TZ,PM,AK,GM,CP	<i>Nd*</i>	ENFF (2; 10,71)	MAI (1) AGO (1)
	MP,IP,TZ,PM,AK,GM,CP	<i>Nd*</i>	UTI (1; 3,57)	ABR (1)
	MP,IP,TZ,PM,AK,GM,CP,AT	<i>Nd*</i>	ENFF (1; 3,57) ENFM (2; 3,57)	FEV (1) OUT (1)
	MP,IP,TZ,PM,AK,GM,CP,AT	<i>Nd*</i>	UC (3; 10,71)	MAI (1) JUL (2) JUL (1)
	MP,IP,TZ,PM,AK,GM,CP,AT	<i>Nd*</i>	UTI (3; 10,71)	OUT (1) NOV (1)
	MP,IP,TZ,PM,AK,GM,CP,PT	<i>Nd*</i>	UTI (1; 3,57)	JAN (1)
	MP,IP,TZ,PM,GM,CP,PT,AT	<i>Nd*</i>	UTI (2; 7,14)	JAN (1) SET (1)
	MP,IP,TZ,PM,GM,CP,PT,AT	<i>Nd*</i>	ENFF (2; 7,14)	JUL (1) OUT (1)
	MP,IP,TZ,PM,AK,GM,CP,PT,AT	<i>Nd*</i>	UC (2; 7,14)	MAI (1) AGO (1)
	MP,IP,TZ,PM,AK,GM,CP,PT,AT	<i>Nd*</i>	UTI (2; 7,14)	JUL (1) OUT (1)
<i>Nd*</i>	Genes codificadores de oxacilinas (<i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-24} , <i>bla</i> _{OXA-51} , <i>bla</i> _{OXA-58} e <i>bla</i> _{OXA-143})			não detectados.

5.2 ESTUDO ANO 2013

Durante o período estudado, foram isoladas 129 amostras de *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* (n=77 e n=52, respectivamente). Das bactérias isoladas, 44 amostras de *A. baumannii* e 19 de *P. aeruginosa* foram resistentes aos carbapenêmicos, oriundas de 63 pacientes. Aspirado traqueal foi o material biológico de onde se isolou com maior frequência as bactérias de interesse (53,9%), seguido de catéter e urina, 19,0% e 12,7%, respectivamente. Entre os pacientes (n=63), a média de idade detectada foi de 72,5 anos (intervalo de 7 a 95 anos). Em relação ao sexo, 25 (39,7%) linhagens foram isoladas de pacientes pertencentes ao sexo feminino e 38 (60,3%) ao sexo masculino. Aproximadamente 78% destes indivíduos estavam hospitalizados em unidades de tratamento intensivo: UTI, UC ou UTI-N (Tabela 5).

Catéter venoso, sonda vesical e ventilação mecânica foram os dispositivos médicos invasivos mais comuns nos pacientes que apresentaram infecção/colonização pelas bactérias de interesse desse trabalho. Durante o período da internação, o uso prévio de drogas β -lactâmicas em associação com inibidores de β -lactamase, como ampicilina-sulbactam e piperacilina-tazobactam, e fluoroquinolonas, como ciprofloxacina e levofloxacina, foi frequente entre os indivíduos com diagnóstico de quadro infeccioso por *A. baumannii* e/ou *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos. Neste trabalho, o motivo ou causa de internação foi distribuído em categorias, conforme descrito na literatura (MEDEIROS, YABUMOTO e MOTTA, 2008). O principal motivo de internação dos pacientes com infecção hospitalar causada pelas bactérias de interesse nesse trabalho foi doença ou complicação clínica. Casos de traumatismo não foram detectados nesse estudo. A proporção de óbito intra-hospitalar foi variável, conforme o agente etiológico: *A. baumannii*: 72,7% e *P. aeruginosa*: 47,3%. O tempo de hospitalização dos indivíduos avaliados foi de aproximadamente 45 dias até o desfecho (óbito intra-hospitalar ou alta).

Tabela 5. Aspectos clínicos-epidemiológicos dos pacientes com quadro infeccioso por *A. baumannii* e/ou *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos, hospitalizados entre janeiro e dezembro de 2013

Parâmetros clínicos-epidemiológicos	Bactérias resistentes aos carbapenêmicos	
	<i>A. baumannii</i> (n=44)	<i>P. aeruginosa</i> (n=19)
Duração (em dias) da hospitalização antes do isolamento bacteriano: média (intervalo)	24,8 (5-112)	25,5 (7-90)
Duração (em dias) da hospitalização: média (intervalo)	44,9 (8-116)	46,5 (15-116)
Motivo da hospitalização: n (%)		
Traumatismo	0 (0)	0 (0)
Complicação clínica	29 (65,9)	14 (73,7)
Complicação neurológica	12 (27,2)	2 (10,5)
Complicação cirúrgica	5 (11,3)	4 (21,0)
Sexo: n (%)		
Masculino	25 (56,8)	13 (68,4)
Feminino	19 (43,2)	6 (31,6)
Idade: n (%)		
0-20 anos	1 (2,2)	1; 5,2
21-40 anos	2 (4,4)	1; 5,2
41-60 anos	5 (11,3)	1; 5,2
> 61 anos	36 (82,1)	16; 84,4
Espécimes clínicos: n (%)		
Aspirado traqueal	28 (63,7)	6 (31,7)
Catéter	9 (20,4)	3 (15,8)
Urina	3 (6,8)	5 (26,3)
Sangue	3 (6,8)	1 (5,2)
Outros	1 (2,3)	4 (21,0)
Unidade de internação: n (%)		
UTI	23 (52,2)	10 (52,6)
UC	14 (31,8)	1 (5,2)
UTI-Neo	1 (2,2)	0 (0)
Enfermaria	6 (13,8)	8 (42,2)
Uso de dispositivos invasivos: n (%)		
Catéter	41 (93,2)	13 (68,4)
Sonda vesical	41 (93,2)	15 (78,9)
Traqueostomia	18 (40,9)	9 (47,3)
Ventilação mecânica	37 (84,1)	13; 68,4
Uso prévio de antimicrobianos: n (%)		
β -lactâmico/inibidor de β -lactamase	33 (75)	10 (52,6)
Cefalosporinas	8 (18,2)	2 (10,5)
Carbapenêmicos	13 (29,5)	5 (26,3)
Fluoroquinolonas	24 (54,5)	7 (36,8)
Aminoglicosídeos	8 (18,2)	5 (26,3)
Sulfazotrim	1 (2,2)	2 (10,5)
Evolução do paciente: n (%)		
Alta	12 (27,3)	19 (52,7)
Óbito intra-hospitalar	32 (72,7)	9 (47,3)

De acordo com o manual CLSI (2014), considerando-se a ocorrência de resistência bacteriana intrínseca a determinadas drogas, não foram considerados resultados da susceptibilidade ao ertapenem, ampicilina-sulbactam, ampicilina, cefoxitina e tigeciclina para *P. aeruginosa*, e ertapenem, ampicilina e cefoxitina para *A. baumannii* (Tabela 6).

Todas as amostras bacterianas estudadas foram sensíveis à ação da colistina, e dentre as amostras de *A. baumannii*, todas demonstraram sensibilidade a tigeciclina. Foi observado 100% de resistência para ciprofloxacina. Igual resultado foi obtido para as drogas β -lactâmicas ceftazidima e cefepime.

Tabela 6: Perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas entre os isolados de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos, durante o ano de 2013

Antimicrobianos	<i>A. baumannii</i> (n=44)		<i>P. aeruginosa</i> (n=19)	
	R (%)	S (%)	R (%)	S (%)
Imipenem	100	0	100	0
Meropenem	100	0	100	0
Ampicilina-sulbactam *	46,7	53,3	-	-
Piperacilina-tazobactam	93,4	6,6	78,9	21,1
Ceftazidima	100	0	100	0
Cefepime	100	0	100	0
Ceftriaxona *	100	0	-	-
Cefuroxima *	100	0	-	-
Amicacina	46,7	53,3	42,0	58,0
Gentamicina	51,1	48,9	22,2	77,8
Ciprofloxacina	100	0	100	0
Tigeciclina *	0	100	-	-
Colistina	0	100	0	100

* Drogas antimicrobianas não testadas contra ambas espécies bacterianas; R: resistência, incluindo resistência intermediária; S: sensibilidade

A avaliação das características fisiológicas bacterianas relacionadas à agressão entre as amostras de *P. aeruginosa* sensíveis e resistentes aos carbapenêmicos evidenciou um comportamento desigual entre as duas condições (Tabela 7).

A avaliação das características fisiológicas associadas à agressão não foi realizada para os isolados de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos, pois durante o ano de 2013 não foram isoladas linhagens sensíveis a estas drogas, impossibilitando assim estas análises.

As linhagens de *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos apresentaram maior número de células bacterianas coradas e agregadas à superfície da placa de poliestireno, comparativamente ao grupo controle (*P. aeruginosa* sensível aos carbapenêmicos). Desta forma, pode-se afirmar que estas amostras apresentaram maior habilidade de formação de biofilme *in vitro*.

A avaliação da resposta *in vitro* frente ao estresse oxidativo das linhagens bacterianas isoladas, mediante uma solução de peróxido de hidrogênio 20%, demonstrou que as amostras de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos apresentaram menor tolerância, quando comparadas ao grupo controle, após leitura em 24 horas. Considerando-se a habilidade hemolítica, em condições *in vitro* de cultivo, as amostras de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos não demonstraram halo de hemólise após leitura em 24 horas de incubação em ágar suplementado com sangue de carneiro.

Tabela 7. Avaliação da habilidade de formação de biofilme e tolerância ao estresse oxidativo de *P. aeruginosa* sensível e resistente aos carbapenêmicos

Característica fisiológica	<i>P. aeruginosa</i>		Valor de p
	Grupo controle (n=25)	Resistente aos carbapenêmicos (n=19)	
	Média (\pm desvio padrão)		
Formação de biofilmes (OD 596nm)	0,88 (\pm 0,64)	1,60 (\pm 1,08)	0,003
Estresse oxidativo (halo inibição, mm)	35,28 (\pm 4,53)	40,1 (\pm 5,96)	0,002

Com relação à tolerância aos biocidas, a tabela abaixo demonstra que a maioria das variações dos halos de inibição ao redor dos discos de papel impregnados com os compostos químicos testados não foi significativa, com exceção de peróxido de hidrogênio na diluição de uso e sabão antisséptico (triclosan 0,5%), em que houve diferenças significativas (Tabela 8) ($p \leq 0,05$).

Tabela 8. Avaliação da tolerância aos biocidas entre isolados de *P. aeruginosa* sensíveis e resistentes aos carbapenêmicos

Biocida	Diâmetro do halo de inibição (mm)		Valor de p
	Grupo controle (n=25)	<i>P. aeruginosa</i> resistente aos carbapenêmicos (n=19)	
Média (\pm desvio padrão)			
Hipoclorito de sódio 1%	9,30 (\pm 5,92)	10,2 (\pm 1,31)	0,258
Hipoclorito de sódio 1,5%	13,8 (\pm 8,35)	13,6 (\pm 2,87)	0,456
Hipoclorito de sódio 2%	16,6 (\pm 10,7)	16,6 (\pm 3,40)	0,495
Quaternário de amônio	18,4 (\pm 6,23)	16,7 (\pm 3,41)	0,142
Peróxido de hidrogênio diluído	7,63 (\pm 3,14)	16,6 (\pm 5,12)	< 0,01
Sabão antisséptico	6,15 (\pm 0,77)	16,9 (\pm 5,18)	< 0,01

Todas as amostras avaliadas pela metodologia analítica utilizada não demonstraram halo de inibição frente à solução de álcool 70% (inclusive grupo controle).

A avaliação da interferência da resistência bacteriana aos carbapenêmicos na expressão de características bacterianas relacionadas à agressão foi realizada utilizando a análise de correlação com a determinação da razão de *Odds ratio*, considerando-se as amostras de *P. aeruginosa* resistentes e sensíveis.

A tabela 9 demonstra que houve correlação positiva entre resistência aos carbapenêmicos e habilidade de formação de biofilmes, tolerância ao quaternário de amônio e ao hipoclorito de sódio 2%.

Tabela 9. Correlação entre características fisiológicas e tolerância a biocidas e resistência a carbapenêmicos em linhagens de *P. aeruginosa* isoladas em um hospital terciário

Parâmetros avaliados		Odds ratio ^a (Intervalo)
Características fisiológicas	Estresse oxidativo ^b	0,28 (0,07-1,02)
	Formação de biofilme	6,68 (1,73-25,82)
Tolerância aos biocidas	Hipoclorito de sódio 1%	0,04 (0,005-0,38)
	Hipoclorito de sódio 1,5%	0,46 (0,13-1,55)
	Hipoclorito de sódio 2%	1,48 (0,44-4,90)
	Quaternário de amônio	2,85 (0,81-10,01)
	Peróxido de hidrogênio diluído	0,03 (0,06-0,20)

^a Odds ratio com 95% de intervalo de confiança: OR = 1, ausência de correlação; OR > 1, correlação positiva; OR < 1, correlação negativa; ^b Estresse oxidativo pela exposição bacteriana ao peróxido de hidrogênio 20%

Considerando a distribuição dos marcadores genéticos de resistência, entre todas as amostras de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* avaliadas, os genes *bla*_{KPC}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SIM}, *bla*_{GIM}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{OXA-24} e *bla*_{OXA-58} não foram detectados pela metodologia utilizada neste estudo (Tabela 10; Figura 2).

Tabela 10. Frequência de detecção dos genes associados à resistência aos carbapenêmicos

Marcadores genéticos	Frequência de detecção n (%)	
	<i>P. aeruginosa</i> (n=19)	<i>A. baumannii</i> (n=44)
<i>bla</i> _{SPM-1}	5 (26,3)	0
<i>bla</i> _{OXA-23}	0	36 (81,8)
<i>bla</i> _{OXA-51}	0	44 (100)
<i>bla</i> _{OXA-143}	0	6 (13,6)
<i>adeB</i>	0	39 (88,6)
<i>mexB</i>	9 (47,3)	0
<i>mexD</i>	9 (47,3)	0
<i>mexF</i>	11 (57,9)	0
<i>mexY</i>	13 (68,4)	0
<i>ampC</i>	4 (21)	0
<i>oprD</i>	9 (47,3)	0
<i>bla</i> _{OXA-2}	2 (10,5)	0
<i>bla</i> _{OXA-10}	2 (10,5)	0

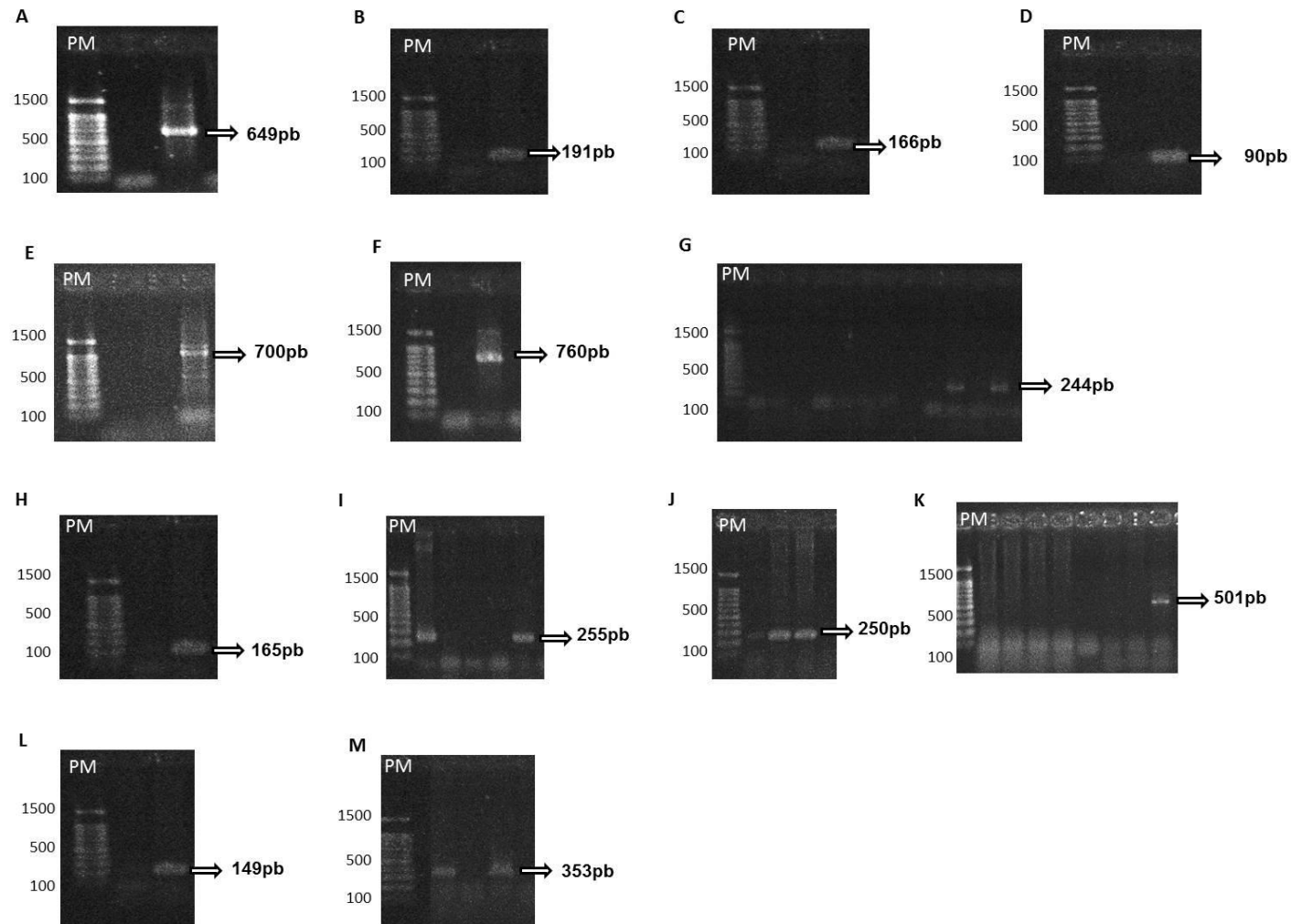


Figura 3. Conjunto de eletroforegramas representativos da amplificação dos diferentes marcadores moleculares avaliados neste estudo: A - *bla*_{SPM-1} (649pb); B - *oprD* (191pb); C - *ampC* (166pb); D - *adeB* (90pb); E - *bla*_{OXA-2} (700pb); F - *bla*_{OXA-10} (760pb); G - *mexB* (244pb); H - *mexD* (165pb); I - *mexF* (255pb); J - *mexY* (250pb); K - *bla*_{OXA-23} (501pb); L - *bla*_{OXA-143} (149pb); M - *bla*_{OXA-51} (353pb). PM – Marcador de peso molecular (pb).

Dentre os isolados de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos, foi possível diferenciar 5 grupos genotípicos distintos, com maior incidência de $bla_{OXA-23}^+/bla_{OXA-51}^+/adeB$ (72,7%). O gene bla_{OXA-51} foi encontrado em todos os isolados, confirmando a identidade da espécie *A. baumannii*.

Dentre as linhagens de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos, foram detectados 14 perfis genotípicos diferentes, com maior frequência de $mexY^+$: 16,8%. Duas amostras bacterianas foram negativas para todos os genes pesquisados. Os genes codificadores de bombas de efluxo foram identificados em 15 amostras. Entre as amostras avaliadas, cinco exibiram o marcador genético de MBL SPM-1.

O detalhamento dos genótipos, bem como a distribuição temporal das amostras bacterianas e seu local de isolamento são apresentados na tabela 11.

Tabela 11. Características fenotípicas e genotípicas de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos isolados de pacientes hospitalizados entre janeiro e dezembro de 2013

Espécie bacteriana	Fenótipo de resistência	Genótipo	Origem das amostras	
			Unidade (n/%)	Mês (n)
<i>A. baumannii</i> (n=44)	MP, IP, TZ, PM, CP, PT, AB, GM, AK	<i>bla</i> _{OXA-51} , <i>bla</i> _{OXA-143} , <i>adeB</i>	UTI-N (1/2,2)	MAR (1)
	MP, IP, TZ, PM, CP, PT, GM, AK	<i>bla</i> _{OXA-51} , <i>bla</i> _{OXA-143} , <i>adeB</i>	UC (1/2,2)	FEV (1)
	MP, IP, TZ, PM, CP, PT, AK	<i>bla</i> _{OXA-51} , <i>bla</i> _{OXA-143} , <i>adeB</i>	UC (2/4,4)	ABR (1) JUN (1)
	MP, IP, TZ, PM, CP, PT	<i>bla</i> _{OXA-51} , <i>bla</i> _{OXA-143} , <i>adeB</i>	UTI (1/2,2)	AGO (1)
	MP, IP, TZ, PM, CP, PT, GM, AK	<i>bla</i> _{OXA-51} , <i>bla</i> _{OXA-143}	ENFF (1/2,2)	MAR (1)
	MP, IP, TZ, PM, CP, PT, AB, AK	<i>bla</i> _{OXA-51} , <i>adeB</i>	UTI (1/2,2)	FEV (1)
	MP, IP, TZ, PM, CP, PT, AB	<i>bla</i> _{OXA-51} , <i>adeB</i>	UTI (1/2,2)	FEV (1)
	MP, IP, TZ, PM, CP, PT, AB	<i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-51}	UTI (1/2,2)	NOV (1)
	MP, IP, TZ, PM, CP, PT, GM	<i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-51}	UC (1/2,2)	AGO (1)
	MP, IP, TZ, PM, CP, AB, PT, GM	<i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-51}	UTI (1/2,2)	DEZ (1)
	MP, IP, TZ, PM, CP, GM	<i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-51}	ENFM (1/2,2)	FEV (1)
	MP, IP, TZ, PM, CP, PT, AB, GM, AK	<i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-51} , <i>adeB</i>	UC (1/2,2) ENFM (1/2,2) UTI (3/6,6)	JAN (1) JAN (1) MAR (1)
	MP, IP, TZ, PM, CP, PT, GM, AK	<i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-51} , <i>adeB</i>		JUN (1) JUL (1) ENFF (1/2,2)

			UTI (4/8,8)	MAR (1)
				MAI (2)
MP, IP, TZ, PM, CP, PT, AB, AK	<i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-51} , <i>adeB</i>			JUN (1)
			UC (2/4,4)	SET (1)
				DEZ (1)
MP, IP, TZ, PM, CP, PT, AK	<i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-51} , <i>adeB</i>		UTI (1/2,2)	JUN (1)
			UC (1/2,2)	OUT (1)
MP, IP, TZ, PM, CP, PT, AB, GM	<i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-51} , <i>adeB</i>		UC (1/2,2)	MAI (1)
			ENFM (1/2,2)	OUT (1)
			UTI (4/8,8)	JUL (1)
				SET (2)
				OUT (1)
MP, IP, TZ, PM, CP, PT, GM	<i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-51} , <i>adeB</i>		ENFM (1/2,2)	JUN (1)
			UC (3/6,6)	MAI (1)
				JUN (1)
				JUL (1)
			UTI (4/8,8)	MAI (1)
				OUT (1)
MP, IP, TZ, PM, CP, AB, PT	<i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-51} , <i>adeB</i>			NOV (1)
				DEZ (1)
			UC (1/2,2)	DEZ (1)
MP, IP, TZ, PM, CP, PT	<i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-51} , <i>adeB</i>		UTI (1/2,2)	AGO (1)
MP, IP, TZ, PM, CP, AB, GM	<i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-51} , <i>adeB</i>		UC (1/2,2)	DEZ (1)
MP, IP, TZ, PM, CP	<i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-51} , <i>adeB</i>		UTI (1/2,2)	NOV (1)
<i>P. aeruginosa</i> (n=19)	MP, IP, TZ, PM, CP, GM	<i>mexB</i> , <i>mexD</i> , <i>mexF</i> , <i>mexY</i> , <i>ampC</i> , <i>oprD</i>	ENFF (1/5,26)	AGO (1)
	MP, IP, TZ, PM, CP, GM, AK	<i>mexB</i> , <i>mexD</i> , <i>mexF</i> , <i>mexY</i> , <i>ampC</i> , <i>oprD</i>	UC (1/5,26)	SET (1)
	MP, IP, TZ, PM, CP, GM, AK	<i>mexB</i> , <i>mexD</i> , <i>mexF</i> , <i>mexY</i> , <i>oprD</i>	UTI (1/5,26)	FEV (1)

MP, IP, TZ, PM, CP, PT, GM, AK	<i>mexY</i>	UTI (1/5,26)	ABR (1)
MP, IP, TZ, PM, CP, GM, AK	<i>mexY</i>	ENFM (1/5,26)	JUN (1)
MP, IP, TZ, PM, CP, GM	<i>mexY</i>	UTI (1/5,26)	JUN (1)
MP, IP, TZ, PM, CP	<i>mexY, oprD</i>	UTI (1/5,26)	DEZ (1)
MP, IP, TZ, PM, CP, GM, AK	<i>mexB, mexD, mexF, mexY, ampC</i>	UTI (1/5,26)	JUN (1)
MP, IP, TZ, PM, CP, GM	<i>mexB, mexD, mexF, oprD, bla_{OXA-10}</i>	ENFM (1/5,26)	SET (1)
MP, IP, TZ, PM, CP, GM	<i>mexB, mexD, mexF, oprD,</i>	UTI (1/5,26)	JUN (1)
MP, IP, TZ, PM, CP	<i>mexB, mexD, mexF, oprD, bla_{OXA-2}</i>	UTI (1/5,26)	SET (1)
MP, IP, TZ, PM, CP, GM, AK	<i>bla_{OXA-10}</i>	UTI (1/5,26)	FEV (1)
MP, IP, TZ, PM, CP, PT, GM	<i>mexB, mexD, mexF, mexY, oprD, bla_{SPM-1}</i>	ENFF (1/5,26)	NOV (1)
MP, IP, TZ, PM, CP, GM, AK	<i>mexB, mexD, mexF, mexY, oprD, bla_{SPM-1}, bla_{OXA-2}</i>	UTI (1/5,26)	FEV (1)
MP, IP, TZ, PM, CP, GM	<i>mexY, bla_{SPM-1}</i>	ENFF (1/5,26)	SET (1)
MP, IP, TZ, PM,	<i>oprD, bla_{SPM-1}</i>	ENFF (1/5,26)	MAI (1)
MP, IP, TZ, PM, CP, PT, GM	<i>mexB, mexD, mexF, mexY, oprD, bla_{SPM-1}, ampC</i>	UTI (1/5,26)	OUT (1)
MP, IP, TZ, PM, CP, PT, GM, AK	<i>Nd*</i>	ENFM (1/5,26)	JUL (1)
MP, IP, TZ, PM, CP, GM	<i>Nd*</i>	ENFM (1/5,26)	MAI (1)

*Nd: não detectado

6 DISCUSSÃO

A evolução constante observada nos microrganismos, inclusive nas bactérias, tem gerado uma diversidade de mecanismos de resistência, e tem como finalidade a adaptação às diferentes pressões seletivas ocorridas no meio ambiente, seja intra ou extra-hospitalar (MUGNIER *et al.*, 2010). O aumento de pacientes colonizados ou infectados por bactérias multirresistentes em ambiente nosocomial tornou-se um problema mundial de saúde pública. Estes quadros infecciosos estão associados com altas taxas de morbidade e mortalidade, bem como internação prolongada e custos excessivos (HULSCHER *et al.*, 2010).

No presente estudo foram avaliadas 88 linhagens de *A. baumannii* e 47 linhagens de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos, obtidos a partir de espécimes clínicos de pacientes internados em um hospital terciário de Juiz de Fora, Minas Gerais, durante os anos de 2012 e 2013.

Idade avançada, predomínio de indivíduos hospitalizados em UTI, uso de dispositivos médicos invasivos, como catéter venoso, sonda vesical e ventilação mecânica, emprego prévio de antimicrobianos, como fluoroquinolonas ou β -lactâmicos em associação com inibidor de β -lactamase, existência de alguma doença de base (patologia clínica) e estadia prolongada em hospital foram fatores predisponentes ao aparecimento de infecção/colonização por microrganismo multirresistente, nos pacientes estudados, durante o ano de 2013, corroborando dados de outras pesquisas (MARRA *et al.*, 2006; PEÑA *et al.*, 2009; PEREZ *et al.*, 2010; ACOSTA *et al.*, 2011; HAMMAMI *et al.*, 2011; CHAULAGAIN *et al.*, 2012 e PIPER e KAPLAN, 2012).

Diferentes índices de mortalidade encontrados em relatos de indivíduos portadores de infecção por linhagens de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos são descritos na literatura. Perez e colaboradores (2010) encontraram 35,3% para *A. baumannii*. Hammami e colaboradores (2011) detectaram 5% de óbito entre os pacientes com infecção por *P. aeruginosa* multirresistente. Este trabalho, no entanto, registrou índices de óbito intra-hospitalar mais elevados, comprovando a dificuldade de sucesso terapêutico.

Aspirado traqueal foi o espécime clínico com maior frequência de detecção das bactérias analisadas neste trabalho. Esse achado é reflexo do emprego da

ventilação mecânica como suporte clínico aos pacientes avaliados, contribuindo para o estabelecimento de um quadro infeccioso. Nowak, Paluchowska e Budak (2012) também isolaram bactérias resistentes aos carbapenêmicos com maior frequência em aspirado traqueal (74% das amostras).

A análise do perfil de susceptibilidade a drogas, revelou ausência de linhagem pan-resistente. As polimixinas B ou E (colistina) se mostraram ativas, *in vitro*, frente às amostras bacterianas avaliadas de *P. aeruginosa*, constituindo-se assim, em possíveis opções terapêuticas para estes casos. Resultado similar foi observado para tigeciclina nos isolados de *A. baumannii*. Haduch (2008), Mohamed e Raafat (2011), John e Balagurunathan (2011) e Sardelic (2012) e colaboradores também encontraram 100% de sensibilidade frente a esses antimicrobianos. Morovat e colaboradores (2009) observaram que 8,8% das linhagens de *A. baumannii* se apresentaram resistentes a polimixina B e tigeciclina (linhagens pan-resistentes), consideradas drogas de última escolha.

Todas as amostras bacterianas avaliadas no estudo prospectivo foram resistentes a ciprofloxacina. Várias pesquisas, nacionais e internacionais, mostram resultados semelhantes (HADUCH, *et al.*, 2008; HAMMAMI *et al.*, 2011; JOHN e BALAGURUNATHAN, 2011; CORREA *et al.*, 2012; NOWAK, PALUCHOWSKA e BUDAK, 2012). O uso prévio, e por vezes extensivo de fluoroquinolonas, em ambiente hospitalar, como observado neste trabalho, e mesmo na comunidade, pode contribuir de forma significativa para selecionar um ambiente para bactérias multirresistentes (PEÑA *et al.*, 2009). A literatura aponta a ciprofloxacina e as demais quinolonas como substratos para diversas bombas de efluxo (QUALE *et al.*, 2006; LLANES *et al.*, 2011). Logo, a detecção de MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY-OprM em isolados neste trabalho podem também contribuir para o fenótipo de resistência a estes antimicrobianos.

As alterações causadas pelo uso extensivo de antimicrobianos podem interferir de forma significativa nas propriedades de antigenicidade, no processo de adesão a superfícies, na produção de enzimas e exotoxinas e, conseqüentemente, na virulência, potencializando ou diminuindo a patogenicidade dos microrganismos (DINIZ *et al.*, 2003). Estudo regional recente realizado pelo nosso grupo de pesquisa (PEREIRA *et al.*, 2015) evidenciou relação entre resistência aos carbapenêmicos (fenotípica e genotípica) com expressão de fatores de virulência, como a produção de biofilmes, tolerância a biocidas e ao estresse oxidativo em linhagens de *Klebsiella*

pneumoniae, obtidas de pacientes hospitalizados. Tal achado pode ser considerado como um fator complicador para o controle de infecção hospitalar e tratamento de indivíduos acometidos por infecções causadas por microrganismos com este perfil.

Neste trabalho, linhagens de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos, isoladas em 2013, não se mostraram capazes de produzir hemolisinas com a metodologia analítica empregada. Entretanto, trata-se de um teste fenotípico, em que a expressão do fenômeno pode ser inibida ou não induzida, conforme as condições ambientais (QUIBLIER *et al.*, 2011).

Os biofilmes são comunidades microbianas complexas que se aderem a superfícies bióticas ou abióticas, envoltas por matriz extracelular polimérica (STEENACKERS *et al.*, 2012) e podem, de alguma forma, estar relacionado com a patogenicidade (NAVES *et al.*, 2008; SANDAL *et al.*, 2007). Acredita-se que as bactérias possuam uma alta capacidade de adesão e formação de biofilmes em superfícies de materiais hidrofóbicos, como o plástico, material utilizado amplamente na confecção de equipamentos empregados nas instituições hospitalares (STEENACKERS *et al.*, 2012). Assim, pode-se formar um reservatório de patógenos nestas estruturas, aumentando o risco de contaminação na sua manipulação, ocasionando problemas de saúde pública (SHI e ZHU, 2009; VESTBY *et al.*, 2009).

Nossos resultados mostraram que os isolados de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos apresentam-se com maior habilidade de formar biofilme em relação aos isolados sensíveis, o que permite sugerir que estas bactérias tenham maior relação com a resistência/persistência hospitalar frente aos mecanismos de controle de população microbiana. Desta forma, é compreensível que aspirado traqueal e catéter venoso sejam os materiais biológicos com maior frequência de isolamento observada neste trabalho.

Embora não tivesse sido possível avaliar a habilidade de formação de biofilme em *A. baumannii*, a literatura revela esta propriedade nesta espécie bacteriana, quando isolada de espécimes clínicos (BAÑO *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2008).

A baixa sensibilidade dos microrganismos aos antimicrobianos, em especial aos carbapenêmicos, pode não estar apenas associada a mecanismos moleculares específicos, mas pode estar relacionada com a formação dos biofilmes bacterianos, que conferem importantes vantagens aos microrganismos, como tolerância à oxidação, à ação dos antibióticos e aos vários desinfetantes (biocidas) de uso hospitalar (WOODFORD *et al.*, 2011).

A correlação negativa obtida entre resistência aos carbapenêmicos e tolerância ao estresse oxidativo, bem como à ação de alguns desinfetantes, em amostras de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos, sugere que elas sejam menos tolerantes ao estresse oxidativo e à ação desses biocidas (hipoclorito de sódio a 1 e 1,5% e o peróxido de hidrogênio diluído). Logo, o uso desses compostos para fins de controle de população microbiana, no cenário hospitalar, permanece encorajado.

Por outro lado, o teste revelou que para hipoclorito de sódio 2% e o quaternário de amônio, as linhagens de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos foram mais tolerantes que o grupo controle. Assim, a ação biocida destes compostos é afetada ou tem correlação com a resistência aos carbapenêmicos, sugerindo restrições ao uso dos mesmos em instituições hospitalares, sobretudo naquelas em que vigora altas frequências de detecção de *P. aeruginosa* multirresistentes.

Para o sabão antisséptico a base de triclosan, utilizado para higiene das mãos de visitantes e equipe clínica do hospital avaliado, não foi possível aplicar o teste estatístico de OR. Linhagens de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos exibiram halos de inibição frente a este biocida maiores que o grupo controle, sugerindo melhor ação bactericida deste composto frente às linhagens multirresistentes que para aquelas consideradas sensíveis às drogas antimicrobianas de interesse médico. O triclosan é um composto de atuação não específica sobre a estrutura e funções da membrana plasmática (CHEN *et al.*, 2009). Estudos apontam este biocida como substrato para inúmeras bombas de efluxo, como MexAB-OprM, MexCD-OprJ e MexEF-OprN, comuns em *P. aeruginosa* (CHUANHUEN *et al.*, 2001). Neste trabalho, um número expressivo de linhagens de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos (n=15) exibiu pelo menos uma destas bombas. Desta forma, é possível que o fenótipo não tenha sido expresso, ainda que houvesse presença de genes codificadores de bombas de efluxo nestas mesmas amostras. Porém, observa-se que o grupo formado por *P. aeruginosa* sensível aos carbapenêmicos se mostrou, *in vitro*, menos tolerante à ação deste composto. Logo, o uso do sabão à base de triclosan, disponibilizado para uso no hospital estudado, não foi capaz de inibir a disseminação destes microrganismos, que embora não exibam fenótipo de resistência aos carbapenêmicos, podem adquirir fragmentos gênicos codificadores de resistência, sugerindo a necessidade

de alteração do composto químico utilizado para higiene das mãos, bem como orientação e treinamento dos profissionais e visitantes acerca deste procedimento.

Considerando a solução de álcool 70%, todas as amostras avaliadas não demonstraram halo de inibição. Este achado, entretanto, não descaracteriza o efeito bactericida deste composto frente às bactérias avaliadas, pois deve-se considerar o seu caráter volátil, em associação com sua capacidade de degradação ao longo do tempo. Outras técnicas analíticas devem ser consideradas para se avaliar, de forma precisa, a eficácia do álcool como agente biocida. O uso do álcool 70% como composto antisséptico ou desinfetante possui ação imediata (ANVISA, 2004). Logo, uma metodologia que empregue leitura em 24 horas pode não refletir a realidade desta substância como biocida.

Bactérias Gram-negativas não fermentadoras de glicose (BGNNF) podem apresentar diferentes mecanismos moleculares de resistência intrínseca e adquirida a uma grande variedade de antimicrobianos rotineiramente empregados na terapia, tais como as penicilinas, cefalosporinas, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas (PEREZ *et al.*, 2007; SCHEFFER *et al.*, 2010). A emergência de isolados clínicos de BGNNF, resistentes a múltiplas classes de antimicrobianos, incluindo os carbapenêmicos, nas últimas décadas, tem sido observada em todos os continentes (HADUCH *et al.*, 2008; PELEG *et al.*, 2008; STRATEVA e YORDANOV, 2009).

Em nosso trabalho, a síntese de enzimas β -lactamases (oxacilinases) foi um mecanismo molecular de resistência aos carbapenêmicos presentes nas linhagens de *Acinetobacter* estudadas, tanto em 2012 quanto em 2013.

O gene *bla*_{OXA-51} possui fraca atividade de lise frente aos carbapenêmicos, mas a regulação de sequências de inserção (como *ISAba1*), pode afetar a expressão de genes próximos, produzindo um forte efeito de carbapenemase (TURTON *et al.*, 2006b; CHAULAGAIN *et al.*, 2012). Não foi objetivo desta pesquisa avaliar a presença de elementos de inserção.

Além disso, a detecção de *bla*_{OXA-51} é de grande valia na correta caracterização da espécie *A. baumannii* (TURTON *et al.*, 2006a). Logo, o achado deste gene em 91% e 100% das amostras de *Acinetobacter*, em 2012 e 2013, respectivamente, qualifica a performance do sistema Vitek 2 Compact® (bioMérieux/França) em identificar esta espécie bacteriana.

Foi possível observar, neste trabalho, um aumento na taxa de detecção do gene *bla*_{OXA-23} em linhagens de *Acinetobacter* nos anos avaliados (56,8% em 2012

para 82,0% em 2013). Este gene tem sido detectado, desde a última década, em vários países, como: Grécia, Tunísia, Bulgária, Coréia do Sul, Itália, China, Espanha, Polônia, Portugal, Chile, inclusive no Brasil (MANSOUR *et al.*, 2008; YANG *et al.*, 2009; ANSALDI *et al.*, 2011; CORREA *et al.*, 2012; LIAKOPOULOS *et al.*, 2012; MANAGEIRO *et al.*, 2012; NOWAK, PALUCHOWSKA e BUDAK, 2012; OPAZO *et al.*, 2012; ESPINAL *et al.*, 2013; JIANG *et al.*, 2013).

No Brasil, a emergência e disseminação de OXA-23 têm sido relatada em vários estados, como Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Rio Grande do Sul, representando um importante mecanismo de resistência aos carbapenêmicos entre isolados clínicos de *A. baumannii* (CARVALHO *et al.*, 2009; CORREA *et al.*, 2012; CHAGAS *et al.*, 2014).

O gene *bla*_{OXA-143} foi identificado pela primeira vez no Brasil, em um isolado clínico de *A. baumannii* multirresistente, em um estudo multi-cêntrico (HIGGINS *et al.*, 2009; MEDEIROS e LINCOPAN, 2013). Trata-se de um determinante genético de resistência ainda pouco estudado e restrito ao Brasil (MEDEIROS e LINCOPAN, 2013; TOWNER *et al.*, 2011). Diferentes índices de prevalência deste gene têm sido encontrados. Este trabalho encontrou 43,2% em 2012 e 13,6% em 2013 de *bla*_{OXA-143}. Werneck e colaboradores (2011) e Antônio e colaboradores, no mesmo ano, reportaram, em hospitais brasileiros, frequências de 8,4% e 58,3%, respectivamente, deste mesmo marcador.

Das amostras de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos, 88,6% apresentaram gene para a bomba de efluxo *adeB*. Esta bomba de efluxo opera, quando super-expressa, de forma sinérgica com baixa permeabilidade de membrana, expulsando aminoglicosídeos, β -lactâmicos e quinolonas, dentre outros compostos. Logo, este achado poderia contribuir para a resistência cruzada observada, neste trabalho, para drogas, como ciprofloxacina e piperacilina-tazobactam.

Embora não foi observado neste estudo resistência à tigeciclina, há relatos de sensibilidade diminuída ou mesmo falha terapêutica durante o tratamento devido a atividade do sistema de efluxo AdeABC para este antimicrobiano (HORNSEY *et al.*, 2010).

A observação de 14 perfis genotípicos distintos nas linhagens de *P. aeruginosa*, isoladas em 2013, sugere-se ausência de disseminação clonal. Sete linhagens exibiram mais de 3 mecanismos moleculares de resistência aos

carbapenêmicos. Esse dado confirma trabalhos anteriores, que associam sistemas de efluxo, expressão aumentada de *ampC* e alteração de porinas (*oprD*) como mecanismos moleculares responsáveis pela resistência aos β -lactâmicos, sobretudo aos carbapenêmicos, em isolados clínicos de *P. aeruginosa* (QUALE *et al.*, 2006; TOMÁS *et al.*, 2010; XAVIER *et al.*, 2010; CABOT *et al.*, 2011).

Neste trabalho, os testes moleculares empregados para avaliar a presença de bombas de efluxo, *ampC* e *oprD* foram baseados na identificação de genes por PCR, e não em análise de expressão. Quale (2006), Vila, Martí e Céspedes (2007), Hornsey (2010), Tomás (2010) e Xavier (2010), em estudos similares a este, observaram que a expressão aumentada dos genes que codificam bombas de efluxo e *ampC*, e a expressão diminuída de *oprD*, contribuem para o fenótipo de resistência aos carbapenêmicos. Considerando que estes marcadores são de origem cromossômica, associa-se a ausência de bombas de efluxo e *ampC* com possível mutação ou falha analítica, considerando que estas amostras estão disponíveis em coleção, podendo sofrer alteração ambiental. Por outro lado, a ausência do gene codificador da porina OprD pode estar associada a alterações de permeabilidade e assim, contribuir para o fenótipo de resistência aos carbapenêmicos.

A única MBL detectada neste estudo foi SPM-1 (26,3%), durante o ano de 2013. Este determinante genético foi primeiramente identificado no Brasil e, até o momento, raros são os achados deste gene em outros países (MARTÍNEZ, POIREL e NORDMANN, 2009; SALABI *et al.*, 2010). No Brasil, vários são os relatos de infecção hospitalar por *P. aeruginosa* portadora de SPM-1 (GALES *et al.*, 2003; MARRA *et al.*, 2006; GASPARETO *et al.*, 2007; FRANCO *et al.*, 2010; SCHEFFER *et al.*, 2010).

Para as amostras de *P. aeruginosa* que se mostraram resistentes ao imipenem/meropenem no teste fenotípico e negativas para os genes pesquisados, é possível que possuam outros mecanismos de resistência, tais como alteração de outras porinas e/ou outros sistemas de efluxo e/ou sintetizem outras enzimas que não aquelas avaliadas neste estudo.

Marcadores genéticos encontrados em *A. baumannii* não foram identificados em *P. aeruginosa* e vice-versa. Esse dado sugere ausência de mobilidade de fragmentos gênicos relacionados com resistência aos carbapenêmicos entre as espécies bacterianas avaliadas.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando o cenário atual, em que a disseminação de bactérias multirresistentes tem limitado as opções terapêuticas para o combate às infecções hospitalares, o conhecimento sobre os mecanismos de resistência às drogas antimicrobianas bem como sua epidemiologia são de extrema importância para se traçar estratégias de tratamento mais eficientes e medidas adequadas ao controle de infecções. Dessa forma, existe a necessidade de responsabilização ética, técnica e social dos gestores de saúde no sentido de prover as condições para a educação continuada de profissionais da área sobre o uso racional de antimicrobianos, o que poderia minimizar os impactos da resistência. Além disso, é necessário planejamento e implementação de medidas específicas e bem estabelecidas, que envolvam, por exemplo, o uso de agentes biocidas mais eficazes nos processos de limpeza, desinfecção e esterilização dos equipamentos e ambientes hospitalares, além da criação de rotinas padronizadas para a inserção, manutenção e retirada de cada dispositivo invasivo (catéter venoso central, ventilação mecânica, etc).

Numa abordagem contemporânea, é de se esperar que o fenômeno da resistência bacteriana possa estar relacionado a alterações nos perfis de expressão gênica bacteriana, com reflexos no potencial agressor desses microrganismos, bem como na sua persistência nos ambientes dos quais deveriam ser removidos.

Assim, estudos prospectivos devem ser incentivados nos diferentes serviços de saúde para a coleta de dados epidemiológicos regionais, que possam fomentar políticas de saúde pública. Dado o elevado índice de morbidade e mortalidade das infecções associadas a *A. baumannii* e *P. aeruginosa* multirresistentes, seu controle criterioso nos ambientes de saúde poderia ser considerado como importante ação de promoção da saúde.

8 CONCLUSÕES

- Idade avançada, predomínio de indivíduos hospitalizados em UTI, uso de dispositivos médicos invasivos, emprego prévio de antimicrobianos, como fluoroquinolonas ou β -lactâmicos em associação com inibidor de β -lactamase, existência de alguma doença de base e estadia prolongada em hospital foram fatores predisponentes ao aparecimento de infecção/colonização por microrganismo multirresistente.
- A multirresistência observada em todas as amostras de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* com fenótipo de resistência aos carbapenêmicos confirma a dificuldade de manejo terapêutico de pacientes com infecções associadas a estes microrganismos. Tigeciclina pode representar opção terapêutica para controle de *A. baumannii*, enquanto as polimixinas podem ser utilizadas para o controle de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* circulantes na região de Juiz de Fora/MG.
- Os isolados de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos apresentam maior tolerância a alguns biocidas de uso hospitalar, o que poderia causar impacto direto no controle epidemiológico deste microrganismo nos centros de saúde.
- A maior habilidade de formação de biofilmes dos isolados de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos pode contribuir para sua persistência no ambiente hospitalar e para o desfecho das infecções associadas, considerando-se hospedeiros imunodeprimidos e a evolução das doenças infecciosas.
- As carbapenemases do tipo oxacilinases (OXA-23, OXA-51 e OXA-143) não estão associadas às linhagens de *P. aeruginosa* isoladas neste trabalho, embora a multirresistência possa estar associada a outros mecanismos, tais

como bombas de efluxo MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY-OprM, síntese de SPM-1 e ausência de *oprD*.

- A produção das oxacilinases, tais como OXA-23, OXA-51 e OXA-143, parece estar bem disseminada entre as linhagens de *A. baumannii*, além da presença de bomba de efluxo *adeB* e ausência de *oprD*.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, J.; MERINO, M.; VIEDMA, E.; POZA, M.; SANZ, F.; OTERO, J.R.; CHAVES, F.; BOU, G. 2011. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* harbouring OXA-24 carbapenemase, Sapin. **Emerging Infectious Diseases**, **17(6)**: 1064-1067.

ALMEIDA, A.C.S.; VILELA, M.A.; CAVALCANTI, F.L.S.; MARTINS, W.M.B.S.; MORAIS, M.A.J. 2012. First description of KPC-2 producing *Pseudomonas putida* in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **55**: 2205-2206.

AMBLER, R.P.; COULSON, A.F.; FRERE, J.M.; GHURYSSEN, J.M.; JORIS, B.; LEVESQUE, R.C.; TIRABY, G.; WALEY, S.G. 1991. A standard numbering scheme for the class A β -lactamases. **Journal Biochemistry**, **276**: 269-270.

ANSALDI, F.; CANEPA, P.; BASSETTI, M.; ZANCOLLI, M.; MOLINARI, M.P.; TALAMINI, A.; GINOCCHIO, F.; DURANDO, P.; MUSSAP, M.; ORENZO, G.; VISCOLI, C.; ICARDI, G. 2011. Sequential outbreaks of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in intensive care units of a tertiary referral hospital in Italy: combined molecular approach for epidemiological investigation. **The Journal of Hospital Investigation**, **79**: 134-140.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde. Edição Comemorativa para o IX Congresso Brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar. Salvador, 30 de agosto a 3 de setembro de 2004.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Organização Pan-Americana de Saúde/Organização Mundial de Saúde. Termo de Cooperação nº 37. Brasília, março de 2006.

ANTONIO, C.S.; NEVES, P.R.; MEDEIROS, M.; MAMIZUKA, E.M.; ARAÚJO, M.R.E.; LINCOPAN, N. 2011. High Prevalence of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Carrying the *bla*_{OXA-143} Gene in Brazilian Hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **55 (3)**: 1322–1323.

BAÑO, J.R.; MARTÍ, S.; SOTO, S.; CUENCA, F.F.; CISNEROS, J.M.; PACHÓN, J.; PASCUAL, A.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; McQUEARY, C.; ACTIS, L.A.; VILA, J. and the Spanish Group for the Study of Nosocomial Infections (GEIH). 2008. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*: associated features and clinical implications. **Clinical Microbiology and Infection**, **14 (3)**: 276-278.

BERTONCHELI, C.M.; HÖRNER, R. 2008. Uma revisão sobre metalo- β -lactamases. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, **44** (4): 577-599.

BLAND, J.M.; ALTMAN, D. G. 2000. Statistics Notes: The odds ratio. **BMJ**. 320 (7247):1468.

BONOMO, R.A.; TOLMASKY, M. 2007. Enzyme mediated resistance to antibiotics: mechanism, dissemination and prospects for inhibition. **American Society of Microbiology**: Washington.

BRACHMAN, P.S. 1998. Epidemiology of nosocomial infection. In: BENNETT, J.V.; BRACHMAN, P.S. (Eds.). **Hospital infections**, **4**: 3-16. Philadelphia: Lippincott-Raven.

BRASIL. **Portaria nº 2.616/MS/GM, de 12 de maio de 1998. 12 mai. 1998.**

Disponível em: <<http://elegis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=482>> Acesso em: 18 ago. 2012.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. 2006. **Goodman & Gilman**: As bases farmacológicas da terapêutica. 11. ed. Rio de Janeiro: Mc. Graw Hill, 1848.

CABOT, G.; SOSA, A.A.O.; TUBAU, F.; MACIA, M.D.; RODRÍGUEZ, C.; MOYA, B.; ZAMORANO, L.; SUÁREZ, C.; PEÑA, C.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; OLIVER, A. and the Spanish Network for Research in Infectious Diseases. 2011. Overexpression of AmpC and efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from bloodstream infections: prevalence and impact on resistance in a Spanish multicenter study. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **55**: 1906-1911.

CARVALHO, K.R.; CARVALHO-ASSEF, A.P.; PEIRANO, G.; SANTOS, L.C.; PEREIRA, M.J.; ASENSI, M.D. 2009. Dissemination of multidrug *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying *bla*OXA-23 collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **International Journal of Antimicrobial Agents**, **34**: 25-28.

CASTANHEIRA, M. 2004. Molecular characterization of a beta-lactamase gene *bla*GIM-1, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **48**: 4654-4661.

CARVALHO-ASSEF, A.P., PEREIRA P.S.; ALBANO, R.M.; BERIAO, G.C.; CHAGAS, T.P.; TIMM, L.N.; SILVA, R.C.F.; FALCI, D.R.; ASENSI, M.D. 2013. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **68**: 2956–2957.

CEZÁRIO, R.C.; MORAIS, L.D.; FERREIRA, J.C.; COSTA-PINTO, R.M.; DARINI, A.L.C.; GONTIJO-FILHO, P.P. 2009. Nosocomial outbreak by imipenem-resistant metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in a adult intensive care unit in a Brazilian teaching hospital. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**: **27(5)**, 269–274.

CHAGAS, T.P.G.; CARVALHO, K.R.; SANTOS, I.C.O.; CARVALHO-ASSEF, A.P.D.; ASENSI, M.D. 2014. Characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Brazil (2008–2011): country wide spread of OXA-23–producing clones (CC15 and CC79). **Epidemiology Infectious**, **2**: 330-330.

CHAULAGAIN, B.P.; JANG, S.J.; AHN, G.Y.; RYU, S.Y.; KIM, D.M.; PARK, G.; KIM, W.Y.; SHUN, J.H.; KOOK, J.K.; KANG, S.; MOON, D.S. AND YOUNG JIN PARK. 2012. Molecular epidemiology of an outbreak of Imipenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the ISAb1-*bla*OXA-51-like genes in a Korean Hospital. **Japan Journal of Infectious Disease**, **65**: 162-166.

CHEN, Y.; PI, B.; ZHOU, H.; YU, Y.; LI, L. 2009. Triclosan resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Medical Microbiology**, **58**:1086-1091.

CHEN, Y.; ZHOU, Z.; JIANG, Y.; YU, Y. 2011. Emergence of NDM-1 producing *Acinetobacter baumannii* in China. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **66**: 1255-1259.

CHUANCHUEN, R.; BEINLICH, K.; HOANG, T.T.; BECHER, A.; KARHOFF-SCHWEIZER, R.R.; SCHWEIZER, H.P. 2001. Cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by multidrug efflux pumps: exposure of a susceptible mutant strain to triclosan selects *nfxB* mutants overexpressing MexCD-OprJ. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, **45**: 428-432.

CHOLLEY, P.; THOUVEREZ, M.; HOCQUET, D.; MEE-MARQUET, N.V.D.; TALON, D.; BERTRAND, X. 2011. Most multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from hospitals in Eastern France belong to a few clonal types. **Journal of Clinical microbiology**, **49**: 2578-2583.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 22th information supplement M100-S22. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 24th information supplement M100-S24. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2014.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 25th information supplement M100-S25. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2015.

CORREA, L.L.; BOTELHO, L.A.B.; BARBOSA, L.C.; MATTOS, C.S.; CARBALLIDO, J.M.; CASTRO, C.L.T.; MONDINO, P.J.J.; PAULA, G.R.; MONDINO, S.S.B.; SOUZA, C.R.V.M. 2012. Detection of *bla*_{OXA-23} in *Acinetobacter spp.* isolated from patients of a university hospital. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases: 16(6)**, 521-526.

DANEL, F.; HALL, L.M.C.; GUR, D.; LIVERMORE, D.M. 1995. OXA-14, another extended - spectrum variant of OXA-10(PSE-2) β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 39(4)**: 1881-1884.

DE CHAMPS, C.; POIREL, L.; BONNET, R.; SIROT, D.; CHANAL, C.; SIROT, J. 2002. Prospective survey of β -lactamases produced by ceftazidim resistance *Pseudomonas aeruginosa* isolated in a French hospital in 2000. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 46(2)**: 3031-3034.

DIJKSHOORN, L.; NEMEC, A.; SEIFERT, H. 2007. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Nature reviews. Microbiology, 5**: 939-951.

DING, J.G.; SUN, Q.F.; LI, K.C.; ZHENG, M.H.; MIAO, X.H.; NI, W.; HONG, L.; YANG, J.X.; RUAN, Z.W.; ZHOU, R.W.; ZHOU, H.J.; HE, W.F. 2009. Retrospective analysis of nosocomial infections in the intensive care unit of a tertiary hospital in China during 2003 and 2007. **BMC Infectious Disease, 9**: 1-6.

DINIZ, C.G.; ARANTES, R.M.; CARA, D.C.; LIMA, F.L.; NICOLI, J.R.; CARVALHO, M.A.R.; FARIAS, L.M. 2003. Enhanced pathogenicity of susceptible strains of the *Bacteroides fragilis* group subjected to low doses of metronidazole. **Microbes and Infection, 5**: 19-26.

EUCAST: "The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 3.1, 2013".

EI AMIN, N.; GISKE, C.G.; JALAL, S.; KEIJSER, B.; KRONVALL, G.; WRETLIND, B. 2005. Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*: alterations

of porin OprD and efflux proteins do not fully explain resistance patterns observed in clinical isolates. **APMIS**, **113**:187-196.

ELLINGTON, M. J.; KISTLER, J.; LIVERMORE, D. M.; WOODFORD, N. 2007. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo- β -lactamases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **59**: 321–322.

ESPINAL, P.; MACIÁ, M.D.; ROCA, I.; GATO, E.; RUÍZ, E.; CUENCA, F.F.; OLIVER, A.; BAÑO, J.R.; BOU, G.; TOMÁS, M.; VILA, J. 2013. First report of an OXA-23 carbapenemase producing *Acinetobacter baumannii* clinical isolate to Tn2006 in Spain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **57(1)**: 589-591.

EUZÉBY, J.P. LPSN. List of prokaryotic names with standing in nomenclature. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/>. Acesso em: 20 abril 2014.

FERNANDES, A.T.; ZAMORANO, O.P.; TOREZANO FILHO, A.M. In: FERNANDES, A.T.; FERNANDES, M.O.V.; RIBEIRO FILHO, N. (Ed.). 2000. *Infecção Hospitalar e suas interfaces na área da saúde*. São Paulo: Atheneu: 516-555.

FALLAH, F.; TAHERPOUR, A.; VALA, M.K.; HASHEMI, A. 2011. Global spread of New Delhi metallo-beta-lactamase-1(NDM-1). **Iran Journal of Clinical Infectious Disease**, **6**: 171-177.

FERNANDEZ-CUENCA, F.; MARTINEZ-MARTINEZ, L.; CONEJO, M.C.; AYALA, J.A.; PEREA, E.J.; PASCUAL, A. 2003. Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **51**: 565-574.

FOGLIA, E.E.; FRASER, V.J.; ELWARD, A.M. 2007. Effect of nosocomial infections due to antibiotic-resistant organisms on length of stay and mortality in the pediatric intensive care unit. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, **28(3)**: 299-306.

FRANCO, M.R.G.; FILHO, H.H.C.; BURATTINI, M.N.; ROSSI, F. 2010. Metallo-beta-lactamase among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian university hospital. **Clinical Science**, **65 (9)**: 825-829.

GALES, A.C.; MENEZES, L.C.; SILBERT, S.; SADER, H.S. 2003. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **52**: 699-702.

GALES, A.C.; CASTANHEIRA, M.; JONES, R.N.; SADER, H.S. 2012. Antimicrobial resistance among Gram negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY antimicrobial surveillance program (Latin America, 2008-2010). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, **73**: 354-360.

GARLANTÉZEC, R.; BOURIGAULT, C.; BOLES, J.M.; PRAT, G.; BARON, R.; TONNELIER, J.M.; COSSE, M.; LEFEVRE, M.; JOURDAIN, S.; LELAY, G.; DANIEL, L.; VIRMAUX, M.; LE DU, I.; TANDE, D.; RENAULT, A.; LEJEUNE, B. 2011. Investigation and management of an imipenem-resistant OXA-23 *Acinetobacter baumannii* outbreak in an intensive care unit. **Medecine et Maladies Infectieuses**, **41**: 430-436.

GARNER, J.S.; JARVIS, W.R.; EMORI, T.G.; HORAN, T.C.; HUGHES, J.M. 1988. Definitions for nosocomial infections. **American Journal Infection Control**, **16**:128-40.

GASPARETO, P.B.; MARTINS, A.F.; ZAVASCKI, A.P.; BARTH, A.L. 2007. Occurrence of *bla*SPM-1 and *bla*IMP-1 genes of metallo- β -lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from three university hospitals in the city of Porto Alegre, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, **38**: 108-109.

GE, C.; WEI, Z.; JIANG, Y.; SHEN, P.; YU, Y.; LI, L. 2011. Identification of KPC-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in China. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 1-2.

GIAMARELLOU, H.; ANTONIADOU, A.; KANELLAKOPOULOU, K. 2008. *Acinetobacter baumannii*: a universal threat to public health? **International Journal of Antimicrobial Agents**, **32**: 106-119.

GORDON, N.C.; WAREHAM, D.W. 2010. Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. **International Journal Antimicrobial Agents**, **35**: 219-226.

HADUCH, J.A.J.; PATERSON, D.L.; SIDJABAT, H.E.; PASCULLE, A.W.; POTOSKI, B.A.; MUTO, C.A.; HARRISON, L.H.; DOI, Y. 2008. Genetic basis of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates at a tertiary medical center in Pennsylvania. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **52**: 3837-3843.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J.W.; STOODLEY, P. 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious by bacterial fibronectin-binding proteins. **Nature Reviews**, **2**: 95-108.

HAMMAMI, S.; BOUBAKER, I.B.B.; GHOZZI, R.; SAIDANI, M.; AMINE, S.; REDJEB, S.B. 2011. Nosocomial outbreak of imipenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-2 metallo- β -lactamase in a kidney transplantation unit. **Diagnostic Pathology**, **6**: 1-5.

HELLINGER, W.C.; BREWER, N. S. 1999. Carbapenems and monobactams: imipenem, meropenem, and aztreonam. **Mayo Clinical Proceedings**, **74 (4)**: 420-434.

HENTZER, M.; TEITZEL, M.G.; BALZER, G.J.; HEYDORN, A.P.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M.; MATTHEW, R. 2001. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure alginate overproduction affects and function. **Journal of Bacteriology**, **183**: 5395-5401.

HILL, E.B.; HENRY, D.A.; SPEERT, D.P. *Pseudomonas* In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; LANDRY, M.L. PFALLER, M.A. **Manual of Clinical Microbiology**, 9th Ed. American Society for Microbiology: Washington, 2007, v.1, cap. 48, p. 734.

HIGGINS, P.G.; POIREL, L.; LEHMANN, M.; NORDMAN, P.; SEIFERT, H. 2009. OXA-143, a novel carbapenem-hydrolysing class D β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **53**: 5035-5038.

HORNSEY, M.; ELLINGTON, M.J.; DOUMITH, M.; THOMAS, C.P.; GORDON, N.C.; WAREHAM, D.W.; QUINN, J.; LOLANS, K.; LIVERMORE, D.M. AND WOODFORD, N. 2010. AdeABC-mediated efflux and tigecycline MICs for epidemic clones of *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **65**: 1589–1593.

HIGGINS, P.G.; LEHMANN, M.; SEIFERT, H. 2010. Inclusion of OXA-143 primers in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter spp.* **International of Journal Antimicrobial Agents**, **35**: 305-307.

HULSCHER, M.E.J.I.; GROU, R.P.T.M.; VAN DEER MEER, J.W.M. 2010. Antibiotic prescribing in hospitals: a social and a behavioral scientific approach. **The Lancet Infectious Diseases**, **10 (3)**: 165-167.

IACONO, M.; VILLA, L.; FORTINI, D.; BORDONI, R.; IMPERI, F.; BONNAL, R.J.; SICHERITZ-PONTEN, T.; DE BELLIS, G.; VISCA, P.; CASSONE, A.; CARATOLLI, A. 2008. Whole genome pyrosequencing of an epidemic multidrug-resistant

Acinetobacter baumannii strain belonging to the European clone II group. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **52**: 2616-2625.

KAASE, M.; NORDMAN, P.; WICHELHAUS, T.A.; GATERMANN, S.G.; BONNIN, R.A.; POIREL, L. 2011. NDM-2 carbapenemase in *Acinetobacter baumannii* from Egypt. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **66**: 1260-1262.

KARAH, N.; HALDORSEN, B.; HERMANSEN, N.O.; TVETEN, Y.; RAGNHILDSTVEIT, E.; SKUTLABERG, D.H.; TOFTELAND, S.; SUNDSFJORD, A.; SAMUELSEN, O. 2011. Emergence of OXA-carbapenemase and 16S rRNA methylase producing international clones of *Acinetobacter baumannii* in Norway. **Journal of Medical Microbiology**, **60**: 515-521.

KARLOWSKY, J.A.; DRAGHI, D.C.; JONES, M.E.; THORNSBERRY, C.; FRIEDLAND, I.R.; SAHM, D.F. 2003. Surveillance for antimicrobial susceptibility among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* from hospitalized patients in the United States, 1998 to 2001. **Antimicrobial Agents of Chemotherapy**, **47**:1681-1688.

KIPNIS, E.; SAWA, T.; WIENER-KRONISH, J. 2006. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. **Medicine et Maladies Infectieuses**, **36**: 78–91.

KLEVENS, R.M.; EDWARDS, J.R.; RICHARDS, C.L.; HORAN, T.C.; GAYNES, R.P.; POLLOCK, D.A. & CARDO, D.M. 2007. Estimating health care-associated infections and deaths in U.S. hospitals, 2002. **Public Health Rep**, **122(2)**: 160-166.

KRESSER, H.; BELSEY, M.; ROVINI, H. 2007. The antibacterial drugs market. **Nature Reviews**, **6**: 19-20.

JAFFAR-BANDJEE, M.C.; LAZDUNSKI, A.; BALLY, M.; CARRE`RE, J.; CHAZALETTE, J.P.; GALABERT, C. 1995. Production of elastase, exotoxin A, and alkaline protease in sputa during pulmonary exacerbation of cystic fibrosis in patients chronically infected by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Clinical Microbiology**, **33**: 924–929.

JERASSY, Z.; YINNON, A.M.; MAZOUZ-COHEN, S.; BENENSON, S.; SCHLESINGER, Y.; RUDENSKY, B. & RAVEH, D. 2006. Prospective hospital-wide studies of 505 patients with nosocomial bacteraemia in 1997 and 2002. **Journal of Hospital Infection**, **62(2)**: 230-236.

JIANG, W.; LIU, H.; ZHONG, M.; YANG, Y.C.; XIAO, D.W.; HUANG, W.F. 2013. Study on the resistant genes to carbapenems and epidemiological characterization of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. **Microbial Drug Resistance**, **19(2)**:117-123.

JOHN, S.; BALAGURUNATHAN, R. 2011. Metallo beta lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. **Indian Journal of Medical Microbiology**, **29(3)**: 302-304.

JOVCIC, B.; LEPSANOVIC, Z.; SULJAGIC, V.; RACKOV, G.; BEGOVIC, J.; TOPISIROVIC, L.; KOJIC, M. 2011. Emergence of NDM-1 metallo-beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Serbia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **55**: 3929-3931.

JONES, C.H.; TUCKMAN, M.; KEENEY, D.; RUZIN, A.; BRADOFRD, P.A. 2009. Characterization and sequence analysis of extended-spectrum-beta-lactamase encoding genes from *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis* isolates collected during Tigecycline phase 3 clinical trials. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **53**: 465-475.

LLANES, C.; KOHLER, T.; PATRY, I.; DEHECQ, B.; VAN DELDEN, C.; PLÉSIAT, P. 2011. Role of the MexEF-OprN Efflux system in low-level resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to ciprofloxacin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **55**: 5676–5684.

LEE, K.; YUM, J.H.; YONG, D.; LEE, H.M.; KIM, H.D.; DOCQUIER, J.D.; ROSSOLINI, G.M.; CHONG, Y. 2005. Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, bla_{SIM}-1, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **49**: 4485-4491.

LEE, H.W.; KOH, Y.M.; LEE, J.C.; LEE, Y.C.; SEOL, S.Y.; CHO, D.T.; KIM, C. 2008. Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. **Clinical Microbiology and Infection**, **14(1)**: 49-54.

LIAKOPOULOS, A.; MIRIAGOU, V.; KATSIFAS, E.A.; KARAGOUNI, A.D.; DAIKOS, G.L.; TZOUVELEKIS, L.S.; PETINAKI, E. 2012. Identification of OXA-23 producing *Acinetobacter baumannii* in Greece, 2010-2011. **European Surveillance**: 1-3.

LIVERMORE, D.M. 2001. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **36**: 2046-2048.

LIVERMORE, D.M.; WILLIAMS, J.D. 1996. Mode of action and mechanism of bacterial resistance. **Antibiotics in Laboratory Medicine**, **4**: 502-578.

LIVERMORE, D.M.; WOODFORD, N. 2006. The β -lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. **Trends in Microbiology**, **14**: 413-420.

MACHADO, G.P.M. 2001. Aspectos epidemiológicos das infecções hospitalares. In: **Manual de Infecção Hospitalar**, MARTINS, M.A. (ed), 2ª ed. MEDSI. Rio de Janeiro, Brasil. p. 27-31.

MANAGEIRO, V.; JONES-DIAS, D.; FERREIRA, E.; LOURO, D.; Antimicrobial Resistance Surveillance Program in Portugal, CANIÇA, M. 2012. Genetic diversity and clonal evolution of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Portugal and the dissemination of ST118. **International Journal Antimicrobial Agents**, **40(5)**: 398-403.

MANSOUR, W.; POIREL, L.; BETTAIEB, D.; BOUALLEGUE, O.; BOUJAAFAR, N.; NORDMANN, P. 2008. Dissemination of OXA-23-producing and carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a University Hospital in Tunisia. **Microbiology Drug Resistance**, **4**: 289-292.

MARRA, A.R.; PEREIRA, C.A.P.; GALES, A.C.; MENEZES, L.C.; CAL, R.G.R.; SOUZA, J.M.A.; EDMOND, M.B.; FARO, C.; WEY, S.B. 2006. Bloodstream infections with metallo- β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology, microbiology, and clinical outcomes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **50(1)**: 388-390.

MARTINS, M.A.; FRANÇA, E.; MATOS, J.C.; GOULART, E.M.A. 2008. Vigilância pós-alta das infecções de sítio cirúrgico em crianças e adolescentes em um hospital universitário de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, **24**: 1033-1041.

MARTINS, A.F.; KUCHENBECKER, R.S.; PILGER, O.K.; PAGANO, M.; BARTH, A.L. 2012. High endemic levels of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* among hospitals in southern Brazil. **American Journal of Infection Control**, **40(2)**: 108-112.

MARTÍNEZ, J.M.R.; POIREL, L.; NORDMAN, P. 2009. Molecular Epidemiology and mechanism of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **53**: 4783-4788.

MEDEIROS, E.A.S.; WEY, S.B.; GUERRA, C. 2005. Diretrizes para a prevenção e o controle de infecções relacionadas à assistência à saúde. Comissão de Epidemiologia Hospitalar, Hospital São Paulo, Universidade Federal de São Paulo. São Paulo.

MEDEIROS, F.; YABUMOTO, R.; MOTTA, F.A. 2008. Fatores de mortalidade em pacientes de UTI de trauma de um hospital de referência colonizados e/ou infectados por *Acinetobacter baumannii*. **Revista Newslab**, **86**: 124-138.

MEDEIROS, M.; LINCOPAN, N. 2013. Oxacillinase (OXA) producing *Acinetobacter baumannii* in Brazil: clinical and environmental impact and therapeutic options. **Brazilian Journal of Pathology and Laboratory Medicine**, **49**: 391-405.

MENDES, R.E.; OPLUSTIL, C.; SAKAGAMI, E.; TURNER, E.; KIFFER, C.; MYSTIC Brazil Group. 2005. Antimicrobial susceptibility in intensive care units: MYSTIC Program Brazil 2002. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, **9**: 44-51.

MELLA, S.M.; ZEMELMAN, C.M.; BELLO, H.T.; DOMÍNGUEZ, M.Y.; GONZÁLEZ, G.R.; ZEMELMAN, R.Z. 2001. Propriedades microbiológicas, clasificación y relación estructura-actividad de cefalosporinas e importancia de las cefalosporinas de cuarta generación. **Revista Chilena de Infectología**, **18 (1)**: 7-19.

MESAROS, N.; NORDMANN, P.; LESIAT, P.; DELVALLEZ, M.R.; ELDERE, J.V.; GLUPCZYNSKI, Y.; LAETHEM, Y.V.; JACOBS, F.; LEBECQUE, P.; MALFROOT, A.; TULKENS, P.M. BAMBEKE, P.M. 2007. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. **Clinical Microbiology and Infection**, **6**: 560–578.

MIREYA, U.A.; MARTÍ, P.O.; XAVIER, K.V.; CRISTINA, L.O., MIGUEL, M.M.; MAGDA, C.M. 2007. Nosocomial infections in pediatric and neonatal intensive care units. **Journal of Infection**, **54(3)**: 212-220.

MIYAWAKI, K.; MIWA, Y.; MASAFUMI, S.; ASARI, S.; TOMONO, K.; KUROKAWA, N. 2012. Correlation between the consumption of meropenem or doripenem and meropenem susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* in a University Hospital in Japan. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, **35**: 946-949.

MOROVAT, T.; BAHRAM, F.; MOHAMMAD, E.; SETAREH, S.; MEHDI, F.M. 2009. Distribution of different carbapenem resistant clones of *Acinetobacter baumannii* in Tehran Hospitals. **New Microbiologica**, **32**: 265-271.

MOHAMED, N.M.; RAAFAT, D. 2011. Phenotypic and genotypic detection of metallo-beta-lactamases in Imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from a tertiary hospital in Alexandria, Egypt. **Research Journal of Microbiology**, **10**: 750-760.

MUGNIER, P.D.; POIREL, L.; NAAS, T.; NORDMANN, P. 2010. Worldwide dissemination of the *bla*OXA-23 carbapenemases gene of *Acinetobacter baumannii*. **Emerging Infectious Diseases**, **16**: 35-40.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; KOBAYASHI, O.S.; PFALLER, M.A. 2004. Microbiologia médica. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

NAAS, T.; BENAODIA, F.; MASSUARD, S.; NORDMANN, P. 2000. Integron-located VEB-1 extended-spectrum β -lactamase gene in a *Proteus mirabilis* clinical isolate from Vietnam. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **46**: 703–711.

NAVES, P.; DEL PRADO, G.; HUELVES, L.; GRACIA, M.; RUIZ.; BLANCO, J.; DAHBI, G.; BLANCO, M.; PONTE, M.D.C.; SOPRIANO, F. 2008. Correlation between virulence factors and in vitro biofilm formation by *E. coli* strains. **Microbial Pathogenesis**, **45**: 86-91.

NEU, H.C. 1985. Relation of structural properties of beta-lactam antibiotics to antibacterial activity. **American Journal of Medicine**, **79**: 2-13.

NEMEC, A.; MUSILEK, M.; SEDO, O.; DE BAERE, T.; MAIXONEROVA, M.; VAN DER REIJDEN, T.J.; ZDRAHAL, Z.; VANECHOUTTE, M.; DIJKSOORN, L. 2010. *Acinetobacter bereziniae* sp. nov. and *Acinetobacter guillouiae* sp. nov., to accommodate *Acinetobacter* genomic species 10 and 11, respectively. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, **60**: 896-903.

NEVES, P.R.; MAMIZUKA, E.M.; LEVY, C.E.; LINCOPAN, N. 2011. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **Brazilian Journal Infectious Diseases**, **27**: 409-420.

NOGUEIRA, P.S.; MOURA, E.R; COSTA, M.M.; MOURA, E.R.F.; COSTA, M.M.F.; MONTEIRO, W.M.S.; BRONDI, L. 2009. Perfil da infecção hospitalar em um hospital universitário. **Revista de Enfermagem UERJ**, **17**: 96-101.

NORDMANN, P.; POIREL, L.; WALSH, T.R.; LIVERMORE, D.M. 2011. The emerging NDM carbapenemases. **Trends Microbiology**, **19**: 588-95.

NOWAK, P.; PALUCHOWSKA, P.; BUDAK, A. 2012. Distribution of *bla*OXA genes among carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* nosocomial strains in Poland. **New Microbiologica**, **35**: 317-325.

OBASI, C.; AGWU, A.; AKINPELU, W.; HAMMONS, R.; CLARK, C.; ETIENNE-CUMMINGS, R.; HILL, P.; ROTHMAN, R.; BABALOLA, S.; ROSS, T.; CARROLL, K.; ASIYANBOLA, B. 2009. Contamination of equipment in emergency settings: an exploratory study with a targetted automated intervention. **Annals of Surgical Innovation and Research**, **3**: 1-9.

O'BRIEN T.F. 2002. Emergence, spread, and environmental effect of antimicrobial resistance: how use of an Antimicrobial anywhere can increase resistance to any antimicrobial anywhere else. **Clinical Infectious Diseases**, **34 (3)**: 78-84.

O'DELSON, D. A.; RASMUSSEN, J. L.; SMITH C. J.; MACRINA F. L. 1987. Extrachromosomal systems and gene transmission in anaerobic bacteria. **Plasmid**, **17**: 87-109.

OLIVER, A. 2004. Resistencia a carbapenemas y *Acinetobacter baumannii*. **Enfermagem Infections Microbiology Clinical**, **22**: 259-261.

OLIVEIRA, A.C.; BETTCHER, L. 2010. Aspectos epidemiológicos da ocorrência de *Enterococcus* resistente a vancomicina. **Revista Escola de Enfermagem da USP**, **44**: 161-165.

OLIVEIRA, A.C.; KOVNER, C.T.; SILVA, R.S. 2010. Nosocomial Infection in an intensive care unit in a Brazilian University Hospital. **Revista Latino-americana de Enfermagem**, **18**: 233-239.

OLIVEIRA, L.J.H.H.; GRANATO, A. C.; HIRATA, D.B.; HOKKA, C.O.; BARBOZA, M.; TRSIC, M. 2009. Ácido clavulânico e cefamicina C: uma perspectiva da biossíntese, processos de isolamento e mecanismo de ação. **Química Nova**, **15 (00)**: 1-9.

OPAZO, A.; DOMINGUEZ, M.; BELLO, H.; AMYES, S.G.B.; ROCHA, G.G. 2012. OXA-type carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* in South America. **Journal of Infectious Developing Countries**, **6(4)**: 311-316.

PARKINS, M.D.; GREGSON, D.B.; PITOUT, J.D.D.; ROSS, T.; LAUPLAND, K.B. 2010. Population-based study of the epidemiology and the risk factors for *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection. **Infection**, **38(1)**: 25-32.

PATERSON, D.L. 2006. The epidemiological profile of infections with multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. **Clinical Infectious Diseases**, **43**: 43-48.

PANNUTI, C.S.; GRINBAUM, R.S. 1995. An overview of nosocomial infection control in Brazil. **Infection Control Hospital Epidemiology Reviews**, **16**: 170-174.

PEARSON, J.P. Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. **Journal of Bacteriology**, **181**: 1203-1210, 1999.
PEIX, A.; RAMÍREZ-BAHENA, M.H.; VELÁSQUEZ, E. 2009. Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. **Infection, Genetics and Evolution**, **9**:1132-1147.

PELEG, A.Y.; ADAMS, J.; PATERSON, D.L. 2007. Tigecycline Efflux as a Mechanism for Nonsusceptibility in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **51(6)**: 2065–2069.

PELEG, A.Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D.L. 2008. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, **21**: 538-582.

PEÑA, C.; SUAREZ, C.; TUBAU, F.; DOMINGUEZ, A.; SORA, M.; PUJOL, M.; GUDIOL, F.; ARIZA, J. 2009. Carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa*: factors influencing multidrug-resistant acquisition in non-critically ill patients. **European Journal of Clinical Infectious Diseases**, **28**: 519-522.

PEREIRA, R.S. Physiological and molecular characteristics of carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter aerogenes* with involvement in bacterial virulence. **Journal of Infection in Developing Countries**. Aceito para publicação em fevereiro de 2015.

PEREZ, F.; HUJER, A.M.; HUJER, K.M.; DECKER, B.K.; RATHER, P.N.; BONOMO, R.A. 2007. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **51**: 3471-3484.

PEREZ, F.; ENDIMIANI, A.; RAY, A.J.; DECKER, B.K.; WALLACE, C.J.; HUJER, K.M.; ECKER, D.J.; ADAMS, M.D.; TOLTZIS, P.; DUL, M.J.; WINDOU, A.; BAJAKSOUUZIAN, S.; JACOBS, M.R.; SALATA, R.A.; BONOMO, R.A. 2010. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* across a hospital system: impact of post-acute care facilities on dissemination. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **65**: 1807-1818.

PEYMANI, A.; MOHAMMED-REZA, N.; SAFAR, F.; HASANI, A.; MIRSALEHIAN, A.; SOHRABI, N.; ABBASI, L. 2011. High prevalence of metallo-beta-lactamase producing *Acinetobacter baumannii* in a teaching hospital in Tabriz, Iran. **Japan Journal Infectious Diseases**, **64**: 69-71.

PFEIFER, Y.; CULLIK, A.; WITTE, W. 2010. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram negative. **International Journal of Medical Microbiology**, **300**: 371-379.

PFEIFER, Y.; WILHARM, G.; ZANDER, E.; WICHERLHAUS, T.A.; GOTTIG, S.; HUNFELD, K.P.; SEIFERT, H.; WITTE, W.; HIGGINS, P.G. 2011. Molecular characterization of *bla*NDM-1 in an *Acinetobacter baumannii* strain isolated in Germany in 2007. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **66**: 1998-2001.

PICÃO, R.C. 2009. Estudo das β -lactamases envolvidas na resistência às cefalosporinas de amplo espectro em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. Tese, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo 122pp.

PIPER, G.L.; KAPLAN, L.J. 2012. Antibiotic Heterogeneity Optimizes Antimicrobial Prescription and Enables Resistant Pathogen Control in the Intensive Care Unit. **Surgical Infections**, **13 (4)**: 194-202.

PITTET, D.; ALLEGRANZI, B.; STORR, J.; BAGHERI-NEJAD, S.; DZIEKAN, G.; LEOTSAKOS, A.; DONALDSON, L. 2008. Infection control as a major World Health Organization priority for developing countries. **Journal of Hospital Infection**, **68 (4)**: 285-292.

POIREL, L.; NORDMAN, P. 2007. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **51**: 3471-3484.

POIREL, L.; NAAS, T.; NORDMANN, P. 2010. Diversity, epidemiology and genetics of class D beta-lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **49**: 1708-1713.

POIREL, L.; NORDMAN, P.; LAGRUTTA, E.; CLEARY, T.; PRICE, S.M. 2011. Emergence of KPC-Producing *Pseudomonas aeruginosa* in the United States. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **54**: 3072.

POOLE, K. 2005. Efflux mediated antimicrobial resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **56**: 7363-7372.

QUALE, J.; BRATU, S.; GUPTA, J.; LANDMAN, D. 2006. Interplay of efflux system, *ampC* and *oprD* expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **50**: 1633-1641.

QUIBLIER, C.; ZINKERNAGEL, A.S.; SCHUEPBACH, R.A.; BERGER-BÄCHI, B.; SENN, M.M. 2011. Contribution of SecDF to *Staphylococcus aureus* resistance and expression of virulence factors. **BMC Microbiology**, **11**: 72-84.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2001. 703 p.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, PK. 2004. **Farmacologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier.

RICE, L.B. 2006. Challenges in identifying new antimicrobial agents effective for treating infections with *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Clinical Infectious Diseases**, **43**: 100-105.

ROBLEDO, I.E.; AQUINO, E.E.; SANTÉ, M.I.; SANTANA, J.L.; OTERO, D.M.; LEON, C.F.; VAZQUEZ, G. J. 2010. Detection of KPC in *Acinetobacter spp.* In Puerto Rico. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **51**: 1354-1357.

ROCHA, A.O.; MENDONÇA, A.C.O.; SÁ, A.C.S.; VALOIS, D.S.; ARAÚJO, J.S.; MENDES, L.M.B.; OLIVEIRA, L.C.S.; ALCÂNTARA, T.Q.N.; NASCIMENTO-CARVALHO, C.M. 2007. Antibioticoterapia em Crianças com Pneumonia. **Gazeta Médica da Bahia**, **77**: 88-92.

ROSENTHAL, V.D.; MAKI, D.G.; JAMURILAT, S.; MEDEIROS, E.A.; TODI, S.K.; GOMEZ, D.Y.;LEBLEBICIOGLU, H.; KHADER, I.A.; NVALES, M.G.M.; BERBA, R.; WONG, F.M.R.; BARKAT, AM.; PINO, O.R.; DUENAS, L.; MITREV, Z.; BIJIE, H.; GURSKIS, V.; JANJ. S.S.; MAPP, T.; HIDALGO, R.F.; JABALLAH, N.B.; RAKA, L.; GIKAS, A.; AHMED, A.; THU, L.T.A.; SIRITT, M.E.G.; INICC MEMBERS. 2010. International nosocomial infection control consortium (INICC) report, data summary for 2003-2008, issued June 2009. **American Journal of Infection Control**, **38**: 95-106.

ROZALES, Q.; RIBEIRO V.B.; MAGAGNIN, C.M.; PAGANO, M.; LUTZ, L.; FALCI, D.R.; MACHADO, A.; BARTH, A.L.; ZAVASCKI, A.P. 2014. Emergence of NDM-1-producing *Enterobacteriaceae* in Porto Alegre, Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, **1-3**.

SADER, H.S. 2000. Antimicrobial resistance in Brazil: comparison of results from two multicenter studies. **Brazilian Journal Infectious Diseases**, **4**: 91-99.

SALABI, A.E.; TOLEMAN, M.A.; WEEKS, J.; BRUDERER, T.; FREI, R.; WALSH, T.R. 2010. First Report of the Metallo- β -lactamase SPM-1 in Europe. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **54 (1)**: 582.

SAMAHA-KFOURY, J.N.; ARAJ, G.F. 2003. Recent developments in β -lactamases and extended-spectrum β -lactamses. **BMJ Journal**, **327**: 273-280.

SANDAL, I.; HONG, W.; SWORDS, W.E.; INZANA, T.J. 2007. Characterization and comparison of biofilm development by pathogenic and commensal isolates of *Histophilus somni*. **Journal of Bacteriology**, **189**: 8179-8185.

SANTOS, N.Q. 2004. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. Texto & Contexto - Enfermagem, 13: 64-70.

SANTOS, K. V. 2009. Alterações fenotípicas induzidas pelo ertapenem e pela piperacilina-tazobactam em amostras de *Bacteroides fragilis* e *Escherichia coli* e implicações na relação bactéria-hospedeiro. Tese. (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, MG, Brasil. 151f.

SARDELIC, S.; BEDENIC, B.; DUPUICH, C.C.; ORHANOVIC, S.; BOSNJAK, Z.; PLECKO, V.; COURNOYER, B.; ROSSOLINI, G.M. 2012. Infrequent finding of metallo β -lactamase VIM-2 in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from Croatia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **56**: 2746-2749.

SAVLI, H.; KARADENIZLI, A.; KOLAYLI, F.; GUNDES, S.; OZBEK, U.; VAHABOGLU, H. 2003. Expression stability of six housekeeping genes: A proposal for resistance gene quantification studies of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time quantitative RT-PCR. **Journal of Medical Microbiology**, **52**: 403-408.

SCHEFFER, M.C.; BAZZO, M.L.; STEINDEL, M.; DARINI, A.L.; CLÍMACO, E.; DALLA-COSTA, L.M. 2010. Intrahospital spread of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a University Hospital in Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **43(4)**: 367-371.

SCHRECKENBERGER, P.C.; DANESHVAR, M.I.; HOLLIS, D.G. 2007. *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella* and other non fermentative Gram negative rods. In: **Murray, P.R. Manual of Clinical Microbiology**, 9th ed. Washington: ASM Press, cap. 50: 770-802.

SCHIMITH-BIER, K.E.; LUIZ, S.O.; SCHEFFER, M.C.; GALES, A.C.; PAGANINI, M.C.; NASCIMENTO, A.J.; CARIGNANO, E.; DALLA COSTA, L.M. 2010. Temporal evolution of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Curitiba, southern Brazil. **American Journal of Infection Control**, **38**: 308-314.

SERRANO P. H. Responsible use of antibiotics in aquaculture. **FAO Fisheries Technical Paper**, **469**. 2005. 97p.

SHAHCHERAGHI, F.; ABBASALIPOUR, M.; FEIZABADI, M.; EBRAHIMIPOUR, G.; AKBARI, N. 2011. Isolation and genetic characterization of metallo-beta-lactamase and carbapenemase producing strains of *Acinetobacter baumannii* from patients at Tehran hospitals. **Iranian Journal of Microbiology**, **3**: 68-74.

SHI X.; ZHU, X. 2009. Biofilm formation and food safety in food industries. **Trends in Food Science & Technology**, **20 (9)**: 407-413.

SIROY, A.; MOLLE, V.; LEMAITRE-GILLIER, C.; VALLENET, D.; PESTEL-CARON, M.; COZZONEA, J.; JOUENNE, T. 2005. Channel formation by CarO, the carbapenem resistance-associated outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **49**: 1432-1440.

SLAMA, T.G. 2008. Gram negative antibiotic resistance: there is a price to pay. **Critical Care**, **S.4**.

SMANI, Y.; McCONNELL, M.J.; PACHON, J. 2012. Role of fibronectin in the adhesion of *Acinetobacter baumannii* to host cells. **PloS one**, **7**, e33073.

SOROOR, A.E.; WALI, I.E.; EL-HODAKY, S.K. 2008. OXA-type beta-lactamase among extended spectrum cephalosporin non susceptible *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected from a large teaching hospital in Cairo. **Egyptian Journal of Microbiology**, **17**: 565-572.

SOUSA, C.M.; MOURA, M.E.; SANTOS, A.M.; NUNES, B.M.V.T.; ALVES, M.S.C.F. 2009. Responsabilidade civil dos profissionais de enfermagem nos procedimentos invasivos. **Revista Brasileira de Enfermagem**, **62**: 717-722.

STEENACKERS, H.; HERMANS, K.; VANDERLEYDEN, J.; DE KEERSMAECKER, S.C.J. 2012. *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. **Food Research International**, **45 (2)**: 502–531.

STOEVA, T.; HIGGINS, P.G.; BOJKOVA, K.; SEIFERT, H. 2008. Clonal spread of carbapenem-resistant OXA-23-positive *Acinetobacter baumannii* in a Bulgarian University. **Clinical Microbiology Infectious**, **14**: 723-727.

STRATEVA, T.; YORDANOV, D. 2009. *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance. **Journal of Medical Microbiology**, **58**: 1133-1148.

TOMÁS, M.; DOUMITH, M.; WARNER, M.; TURTON, J.F.; BECEIRO, A.; BOU, G.; LIVERMORE, D.M.; WOODFORD, N. 2010. Efflux Pumps, OprD Porin, AmpC β -Lactamase, and Multiresistance in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Cystic Fibrosis Patients. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **54**: 2219–2224.

TOGNIM, M.C.; GALES, A.C.; PENTEADO, A.P.; SILBERT, S.; SADER, H.S. 2006. Dissemination of IMP-1 metallo-beta-lactamase producing *Acinetobacter baumannii* in a Brazilian teaching hospital. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, **27**: 742-747.

TOMARAS, A.P.; DORSEY, C.W.; EDELMAN, R.E.; ACTIS, L.A. 2003. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. **Microbiology**, **149**: 3473-3484.

TORRES, A.H; VASQUEZ, E.G.; YAGUE, G.; GÓMEZ, J.G. 2010. *Acinetobacter baumannii* multiresistente: situación clínica actual y nuevas perspectivas. **Revista Española de Quimioterapia**, **23**: 12-19.

TOWNER, K.J.; EVANS, B.; VILLA, B.; LEVI, K.; HAMOUDA, A.; AMYES, S.G.B.; CARATTOLI, A. 2011. Distribution of intrinsic plasmid replicase genes and their association with carbapenem hydrolyzing class D β -lactamase genes in European Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **55 (5)**: 2154-2159.

TURTON, J.F.; WOODFORD, N.; GLOVER, J.; YARDE, S.; KAUFMANN, M.E.; PITT, T.L. 2006a. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the *bla*OXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species. **Journal of Clinical Microbiology**, **44**: 2974-2976.

TURTON, J.F.; WARD, E.; WOODFORD, N.; KAUFMANN, M.E.; PIKE, R.; LIVERMORE, D.M.; PITT, T.L. 2006b. The role of ISAba1 in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. **FEMS Microbiology Letters**, **258**: 72-77.

VILA, J.; MARTÍ, S.M.; CÉSPDES, J.S. 2007. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **59**: 1210-1215.

VESTBY, L.K.; MORETRO, T.; LANGSRUD, S.; HEIR, E.; NESSE, L.L. 2009. Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal and feed factories. **BMC Veterinary Research**, **5 (20)**: 1-6.

VILLEGAS, M.V.; LOLANS, K.; CORREA, A.; KATTAN, J.N.; LOPEZ, J.A.; QUINN, J.P. and the Colombian Nosocomial Resistance Study Group. 2007. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem hydrolyzing beta-Lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **51**: 1553–1555.

XAVIER, D.E.; PICÃO, R.C.; GIRARDELLO, R.; FEHLBERG, R.C.C.; GALES, A.C. 2010. Efflux pumps expression and its association with porin down regulation and β -lactamase production among *Pseudomonas aeruginosa* causing bloodstream infections in Brazil. **BioMed Central Microbiology**, **10**: 1-7.

YANG, H.Y.; LEE, H.J.; SUH, J.T.; LEE, K.M. 2009. Outbreaks of Imipenem Resistant *Acinetobacter baumannii* Producing OXA-23 β -Lactamase in a Tertiary Care Hospital in Korea. **Yonsei Medical Journal**, **50(6)**: 764-770.

YIGIT, H.; QUEENAN, A.M.; ANDERSON, G.J.; DOMENECH-SANCHEZ, A.; BIDDLE, J.W.; STEWARD, C.D. 2001. Novel Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **45(4)**: 1151-1161.

YONEDA, K.; CHIKUMI, H.; MURATA, T.; GOTOH, N.; YAMAMOTO, H.; FUJIWARA, H.; *et al.* 2005. Measurement of *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux pumps by quantitative real-time polymerase chain reaction. **FEMS Microbiology Letters**: **243**: 125-131.

YOSHIHARA, E. Gotoh, N.; Nishino, T.; Nakae, T. 1996. Protein D2 porin of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane bears the portease activity. **FEBS Letters**, **394**: 179-182.

WALSH, T.R.; TOLEMAN, M.A.; POIREL, L.; NORDMAN, P. 2005. Metallo-beta-lactamases: The quiet before the storm? **Clinical Microbiology Reviews**, **18**: 306-325.

WERNECK, J.S.; PICÃO, R.C.; GIRARDELLO, R.; CAYO, R.; MARGUTTI, V. DALLA-COSTA, L.; GALES, A.C. ANTONIO, C.S.; NEVES, P.R.; MEDEIROS, M.; MAMIZUKA, E.M.; ARAUJO, M.R.E.; LINCOPAN, N. 2011. Low prevalence of *bla*OXA-143 in private hospitals in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **55 (9)**: 4494-4495.

WIBBENMEYER, L.; WILLIAMS, I.; WARD, M.; XIAO, X.; LIGHT, T.; LATENSER, B.; LEWIS, R.; KEALEY, G.P. & HERWALDT, L. 2010. Risk factors for acquiring vancomycin-resistant *Enterococcus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on a burn surgery step-down unit. **Journal of Burn Care and Research**, **31(2)**: 269-279.

WITTE, W. Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: environment. 2000. **International Journal of Antimicrobial Agents**, **14**: 321-325.

WISPLINGHOFF, H.; SCHMITT, R.; WOHRMANN, D.; STEFANIK, D.; SEIFERT, H. 2007. Resistance to disinfectants in epidemiologically defined clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Hospital Infection**, **66**: 174-181.


WOODFORD, N.; ELLINGTON, M.J.; COELHO, J.M.; TURTON, J.F.; WARD, M.E.; BROWN, S.; AMYES, S.G.; LIVERMORE, D.M. 2006. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter spp.* **International Journal Antimicrobial Agents**, **4**: 351-353.

WOODFORD, N.; TURTON, J.F.; LIVERMORE, D.M. 2011. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, **35 (5)**: 736-755.

WROBLEWSKA, M.M.; SAWICKA-GRZELAK, A. MARCHEL, H.; LUCZAK, M.; SIVAN, A. 2008. Biofilm production by clinical strains of *Acinetobacter baumannii* isolated from patients hospitalized in two tertiary care hospitals. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, **53**: 140-144.

10 ANEXOS

ANEXO 1 – Parecer Comitê de Ética



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRO-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP/UFJF
36034900- JUIZ DE FORA - MG - BRASIL

Parecer nº 346/2011

Protocolo CEP-UFJF: 2587.327.2011 **FR:** 489968 **CAAE:** 0333.0.180.180-12

Projeto de Pesquisa: Aspectos fisiológicos e moleculares da virulência e resistência aos carbapenêmicos em bastonetes Gram negativos, isolados em um hospital terciário.

Area Temática: Grupo III

Pesquisador Responsável: Vania Lúcia Silva

Data prevista para o término da pesquisa: Janeiro de 2016

Pesquisadores Participantes: Vania Lúcia Silva; Vanessa Cordeiro Dias; Cláudio Galuppo Diniz; André Netto Bastos; Ricardo Villela Bastos.

Instituição Proponente: Universidade Federal de Juiz de Fora / Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia – Instituto de Ciências Biológicas.

Análise do protocolo:

Itens Avaliados		Sim	Não	P	NA
Justificativa	O estudo proposto apresenta pertinência e valor científico	X			
	Objeto de estudo está bem delineado	X			
Objetivo(s)	Apresentam clareza e compatibilidade com a proposta	X			
	Atende ao(s) objetivo(s) proposto(s)	X			
Material e Métodos	Informa				
	Tipo de estudo	X			
	Procedimentos que serão utilizados	X			
	Número de participantes	X			
	Justificativa de participação em grupos vulneráveis				X
	Critérios de inclusão e exclusão				X
	Recrutamento	X			
	Coleta de dados	X			
Revisão da literatura	Atualiza e sustentam o(s) objetivo(S) do estudo	X			
	Informa os possíveis impactos e benefícios	X			
Resultados	Agenda as diversas etapas de pesquisa	X			
	Informa que a coleta de dados ocorrerá após aprovação do projeto pelo comitê	X			
Cronograma	Lista a relação detalhada dos custos da pesquisa	X			
	Apresenta o responsável pelo financiamento	X			
Referências	Segue uma normatização	X			
	Preserva o sujeito de constrangimento	X			
Instrumento de coleta de dados	Apresenta pertinência com o(s) objetivo(s) proposto(s).	X			
	Solicita dispensa	X			
Termo de dispensa de TCLE					
Termo de assentimento	Apresenta o termo em caso de participação de menores				X

1



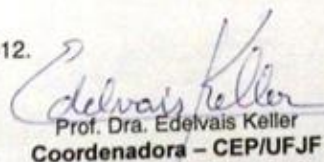
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRO-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP/UFJF
36056900- JUIZ DE FORA - MG - BRASIL

TCLE	Está em linguagem adequada, clara para compreensão do sujeito				X	
	Apresenta justificativa e objetivos				X	
	Descreve suficientemente os procedimentos				X	
	Apresenta campo para a identificação dos sujeitos				X	
	Informa que uma das vias do TCLE deverá ser entregue ao sujeito				X	
	Assegura liberdade do sujeito recusar ou retirar o consentimento sem penalidades				X	
	Garante sigilo e anonimato				X	
	Explicita	Riscos e desconfortos esperados				X
		Ressarcimento de despesas				X
		Indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa				X
Forma de contato com o pesquisador					X	
Forma de contato com o CEP					X	
	Como será o descarte de material coletado (no caso de material biológico)				X	
	O arquivamento do material coletado pelo período mínimo de 5 anos				X	
Pesquisador (es)	Apresentam titulação e experiência compatível com o projeto de pesquisa	X				
	Apresenta comprovante do Currículo Lattes do pesquisador principal e dos demais participantes.		X			
Documentos	Carta de Encaminhamento à Coordenação do CEP	X				
	Folha de Rosto preenchida	X				
	Projeto de pesquisa, redigido conforme Modelo de Apresentação de Projeto de Pesquisa padronizado pela Pró-Reitoria de Pesquisa (PROPESQ)	X				
	Declaração de infraestrutura e de concordância com a realização da pesquisa, assinada pelo responsável pelo setor/serviço onde será realizada a pesquisa	X				

P= parcialmente NA=Não se aplica

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa - CEP/UFJF, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto, devendo o pesquisador entregar o relatório no final da pesquisa.

Situação: Projeto Aprovado
Juiz de Fora, 25 de abril de 2012.

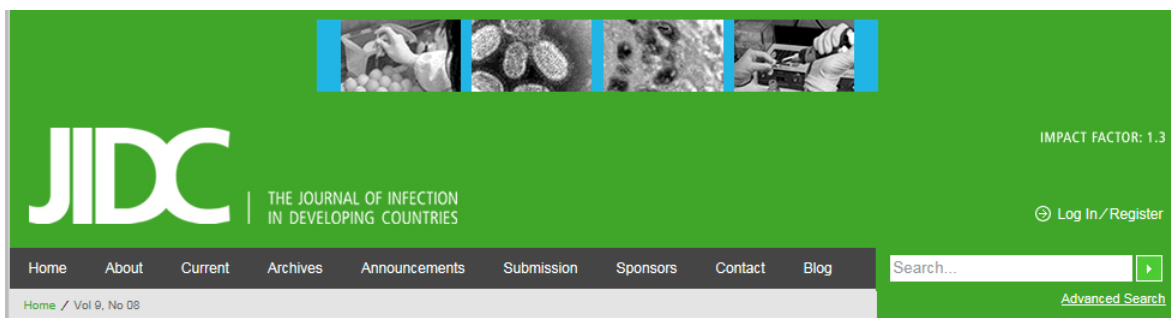

Prof. Dra. Edelvais Keller
Coordenadora - CEP/UFJF

RECEBI
DATA: ___/___/2012
ASS: _____

11 APÊNDICES

PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O PERÍODO (2013-2015)

11.1 ARTIGO 1



Epidemiological characteristics and antimicrobial susceptibility among carbapenem-resistant non-fermenting bacteria

Vanessa Cordeiro Dias^{1,2}, Cláudio Galuppo Diniz¹, Ana Cláudia de Oliveira Peter², André Netto Bastos², Victor Quinnet de Andrade Bastos², Lucas Quinnet de Andrade Bastos² and Vânia Lúcia da Silva^{1,*}

¹*Department of Parasitology, Microbiology and Immunology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, 36036-900, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil;*

²*Cortes Villela Clinical Laboratory, 36016-904, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil.*

Aceito em 09/09/2015

Epidemiological characteristics and antimicrobial susceptibility among carbapenem-resistant non-fermenting bacteria isolated from patients admitted in a Brazilian tertiary hospital

Vanessa Cordeiro Dias^{1,2}, Cláudio Galuppo Diniz¹, Ana Cláudia de Oliveira Peter², André Netto Bastos², Victor Quinnet de Andrade Bastos², Lucas Quinnet de Andrade Bastos², and Vânia Lúcia da Silva^{1,*}

¹*Department of Parasitology, Microbiology and Immunology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, 36036-900, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil;*

²*Cortes Villela Clinical Laboratory, 36016-904, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil.*

Corresponding author

Vania Lucia Silva, PhD

Laboratory of Bacterial Physiology and Molecular Genetics, Department of Parasitology, Microbiology and Immunology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, 36.036-900, Juiz de Fora, MG, Brazil.

Phone: + 55 32 2102-3213

Fax: + 55 32 2102-3213

E-mail: vania.silva@ufjf.edu.br

Abstract

Introduction: The non-fermenting Gram-negative bacteria, such as *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* are widespread in the environment and are increasingly associated with severe nosocomial infections. Extensive and sometimes indiscriminate use of antibiotics in hospitals has contributed to an increased number of infections caused by *A. baumannii* and *P. aeruginosa* that are resistant to a wide variety of antimicrobials, including β -lactams. This study aimed to isolate and identify carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. and *P. aeruginosa* from hospitalized patients, to determine their antimicrobial susceptibility patterns, and to screen for *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-58} and *bla*_{OXA-143} genes among the isolated bacteria. **Methodology:** Antimicrobial resistance patterns were performed using the disc-diffusion method. Genetic markers related to carbapenem resistance were screened by PCR. **Results:** Carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. (n=44) and *P. aeruginosa* (n=28) samples were isolated from patients admitted into a tertiary hospital. Polymyxin B was the only effective drug for all isolates. Considering the oxacillinase genes screening, genetic markers were observed only in *Acinetobacter* isolates. The most frequent genotype observed was *bla*_{OXA-23}⁺/*bla*_{OXA-51}⁺ (45.5%), followed by *bla*_{OXA-51}⁺/*bla*_{OXA-143}⁺ (41%). The oxacillinase genes *bla*_{OXA-24} and *bla*_{OXA-58} were not detected. High mortality rates (> 70%) were observed. **Conclusions:** The data suggest the need for rational use of antimicrobials associated with early diagnosis of multi-drug resistant bacteria, especially considering non-fermenting Gram-negative rods, which are widespread in Brazilian hospitals. The findings of *bla*_{OXA-51}⁻ strains may suggest the occurrence and spread of non *A. baumannii* species throughout our hospitals. Effective implementation of surveillance programs in hospitals are needed to reduce infectious and resistant intra and interspecies bacteria.

Key words: *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, carbapenem-resistant bacteria

Running Title: Carbapenem-resistant Gram negative bacteria

Introduction

The non-fermenting Gram-negative (NFGN) bacteria are widely distributed in the environment and are highly associated with severe opportunistic nosocomial infections, mainly in immunocompromised patients [1,2]. The NFGN are resistant to most available antimicrobial drugs, mainly due to their ability to acquire resistance genes through horizontal transfer but also to their ability to persist in the open environment for long periods on nosocomial surfaces [3].

The clinical relevance of multi-drug resistant NFGN-associated infection is characterized by their opportunistic nature and their laborious and costly treatment and management, with high morbidity and mortality rates [4]. These infections are frequently found in intensive care patients with pneumonia symptoms associated with mechanical ventilation, bacteremia introduced by central venous catheter, or urinary tract infection [5].

NFGN bacteria may display different mechanisms of intrinsic and acquired resistance to a large number of antimicrobials routinely employed in medical therapy, such as, penicillins, cephalosporins, aminoglycosides, and fluoroquinolones. Carbapenems are still the drugs of choice to treat infections associated with the drug-resistant NFGN bacteria [2,6]. Nevertheless, carbapenem-resistance among *Pseudomonas* and *Acinetobacter* has emerged and become widespread, demanding increased efforts to treat infection with chemotherapy, using polymyxin B and tigecycline, the last therapeutic option [5,7,8].

Among the NFGN bacteria, *Pseudomonas* and *Acinetobacter* are the main drug-resistant groups associated with nosocomial infections and are well known for their ability to express

several drug-resistant mechanisms, such as; production of β -lactamases and altered surface porins and efflux pumps. β -lactamases production constitutes the major NFGN resistance mechanisms from the epidemiological viewpoint, including production of serine and metallo- β -lactamases, which is related to the carbapenems resistance [9].

Serine- β -lactamases (such as, class D β -lactamases) are also known as oxacillinases or OXA-type β -lactamases and display a variable hydrolytic activity against the β -lactam drugs. So far, 121 different variants of oxacillinases have been described, 45 of which have hydrolytic activity on carbapenems [10]. Of these, *bla*_{OXA} genes are important genetic and epidemiological markers that confirm identification of carbapenem-resistant NFGN bacteria. OXA-23, a clavulanic acid-resistant oxacillinase, is a plasmid-coded enzyme, which hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins, aztreonam, and feebly hydrolyzes imipenem and meropenem [11]. OXA-24 is associated to bacteria resistance against third and fourth cephalosporin generations as well as carbapenems. In most cases, these microorganisms are multiresistant and sensitive to polymyxin B and colistin [12-15]. OXA-51 is a chromosomally-coded oxacillinase present in the *Acinetobacter baumannii* species with a distinct hydrolytic action on carbapenems, i.e., slow imipenem hydrolysis and non-meropenem inactivation [16,17]. OXA-58 was first described in 2003 in *A. baumannii*, and rapidly spread to the other countries [18-24]. This enzyme is associated to resistance against carbapenems, third and fourth cephalosporin generations, and monobactams [25]. OXA-143 is still little studied and restricted to Brazil. It was identified in a clinical isolate of multiresistant *A. baumannii* [26-29]. β -lactamase OXA-143 hydrolyze penicillins and carbapenems but not significantly hydrolyze expanded-spectrum cephalosporins, as observed with other carbapenem-hydrolyzing class D- β -lactamase [26].

Knowledge on the occurrence, distribution, and antimicrobial susceptibility of oxacillinase-producing bacteria may be highly relevant to help prevent a misuse of antimicrobial agents and guide a suitable therapy. Thus, this study was focused on the epidemiological characteristics, antimicrobial susceptibility patterns and genetic screening for oxacillinase genes in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp., isolated from patients admitted in a Brazilian tertiary hospital between January and December of 2012.

Methodology

Study design, patients and bacteria collection

This is a cross-sectional study based on routinely collected data from patients admitted into a Brazilian tertiary hospital in Juiz de Fora, Minas Gerais, between January 1st and December 31st, 2012. None of the sampled patients were diagnosed with infectious diseases by the time of admission. The hospital is a 120 beds private institution, which includes general and specialized surgical unities, adult, infant and neonatal intensive care unities, nursery unit, coronary care unit, male, female and infant wards, outpatient care, diagnostic centre including clinical analysis and pathological anatomy laboratories. The Ethics Committee of the Federal University of Juiz de Fora (Certificate no. 346/2011) approved this study. Bacterial samples isolated from clinical specimens were sent to the hospital's clinical pathology laboratory (mainly urine, blood, tracheal secretion and catheter tip cultures) in accordance with the guidelines described by the Brazilian Health Surveillance Agency [30].

After initial bacteria were isolated from monomicrobial cultures, all the presumptively identified NFGN rods were identified using the Vitek 2 System (BioMerieux, France); *Acinetobacter* spp. and *P. aeruginosa* were selected for further studies, as described below. Patients' demographic and clinical characteristics were recovered from corresponding medical records.

Antimicrobial susceptibility patterns

Antimicrobial susceptibility assays were performed on Mueller–Hinton agar (BD-Difco), using the disc-diffusion method. Growth inhibition zones were interpreted according to the Clinical and Laboratory Standards Institute [31] with the exception of tigecycline [32].

Antimicrobial disks of amikacin (30µg), gentamicin (10µg), ciprofloxacin (5µg), polymyxin B (300U), piperacillin-tazobactam (100/10µg), ceftazidime (30µg), cefepime (30µg), meropenem (10µg), and imipenem (10µg) were tested against *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* spp.. Additional disks of sulphazotrim (25µg), tetracycline (30µg), ampicillin-sulbactam (10/10µg) were tested against *Acinetobacter* spp., and an additional disk of aztreonam (30µg) was tested against *P. aeruginosa*. All the antimicrobial discs were of commercial grade (Laborclin Ltda, Brazil). *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 35218 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 were used for quality control.

Screening of *bla*_{OXA} genes among the carbapenem-resistant bacteria

For the isolated imipenem and meropenem-resistant *Acinetobacter* spp. and *P. aeruginosa* strains, polymerase chain reactions were carried out targeting the *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-58} and *bla*_{OXA-143} genes coding for oxacillinases enzymes. The genetic screening was performed using primers and conditions previously described [26,33].

Briefly, bacterial genomic DNA were extracted from 1 ml of overnight cultures in Tryptic Soy Broth (BD-Difco, Brazil) using the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation, USA) following the manufacturer's instructions. The DNA extracts were quantified using NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, USA) and stored at -20°C, to be used as templates in polymerase chain reactions (PCR). The primer sequence, amplicon size and amplification conditions are described in table 1. All the PCR experiments were performed in duplicate. The expected amplicons were visualized in 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide. The 1kb DNA ladder was used as molecular weight standard (Life Technologies, USA). Positive controls for PCR reactions were carried out by sequencing randomly selected amplicons comprising 10% of the total reactions. The PCR products were sequenced in an ABI Prism 3730 DNA sequencer (Applied Biosystems, USA).

Patient chart review

We reviewed the medical records of the hospital-admitted patients whose carbapenem-resistant *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. were isolated. The following demographic and clinical data were retrieved: age, sex, clinical specimens for microbiological culture, patient admission unit and mortality attributable to the infection by carbapenem-resistant NFGN isolates.

Results

Over the sampled period, NFGN were isolated from 183 hospital admitted patients, including urine, blood, tracheal secretion and catheter tip cultures (49 non-replicated isolates of *Acinetobacter* spp. and 134 isolates of *P. aeruginosa*). Of the isolated bacteria, 44 samples of *Acinetobacter* spp. and 28 samples of *P. aeruginosa* were carbapenem-resistant, representative of 72 patients, distributed as follows, according to their admission unit: intensive care unit (n=42, 58.4%), male and female wards (n=17, 23.6%), coronary care unit (n=12, 16.6%) and neonatal intensive care unit (n=1, 1.4%).

The sociodemographic data, clinical specimens, and the mortality associated with the colonization and infection by carbapenem-resistant NFGN isolates are presented in table 2. Considering the *Acinetobacter*-associated patients, the mean patient age was 69.6 years old

(ranging between 11 days old and 96 years old); 21 (47.7%) bacterial strains were isolated from female patients, while 23 (52.3%) strains were isolated from males. *Pseudomonas*-associated patients had a mean age of 71.7 years old (ranging from 30 to 92 years old); 20 (71.5%) bacterial strains were isolated from female patients and 8 (28.5%) were isolated from males. Overall, the main clinical specimen for microbiological culture was tracheal secretion followed by urine and catheter tip. Unfortunately, the patients' mortality rate was high, accounting for 77.2% of the cases associated with *Acinetobacter* colonization and infections and 78.5% of the cases associated with *Pseudomonas* colonization and infections.

All the studied bacterial samples were resistant to ceftazidime, cefepime, imipenem and meropenem. With regards to the *Acinetobacter* strains, resistance was also observed against ciprofloxacin (100%), piperacillin-tazobactam (100%), gentamicin (87.1%), ampicillin-sulbactam (83.4%), amikacin (77.8%), tetracycline (55.6%), and sulphazotrim (55.6%). As for *Pseudomonas* strains, resistance was also observed against ciprofloxacin (90.2%), aztreonam (90.2%), amikacin (63.4%), piperacillin-tazobactam (34%) and gentamicin (19.5%). Resistance to tigecycline and polymyxin B was not observed in *Acinetobacter* and *Pseudomonas* did not appear resistant to polymyxin B (Table 3).

At least one of the genetic markers related to oxacillinases *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-51}, or *bla*_{OXA-143} was detected in all *Acinetobacter* strains recovered in this study. The genotype *bla*_{OXA-23}⁺/*bla*_{OXA-51}⁺ was the most frequently observed (45.5%), followed by *bla*_{OXA-51}⁺/*bla*_{OXA-43}⁺, observed in 41% of the bacterial strains. The genotype *bla*_{OXA-23}⁺ was observed in 9% of the isolated bacteria. The genetic markers *bla*_{OXA-24} and *bla*_{OXA-58} were not observed in any of the *Acinetobacter* samples. With regards to the *P. aeruginosa* isolates, none of the genetic markers were observed (Table 4).

Discussion

As long as antimicrobial resistance against carbapenems in nosocomial strains of *Acinetobacter* and *Pseudomonas* is being reported worldwide, monitoring the drug susceptibility patterns in health-care associated bacteria is extremely important to guide the clinical management and chemotherapy of NFGN infections [2,7,8]. In this regard, appropriate laboratory handling of clinical specimens and microbiological procedures is also necessary. In this study, imipenem and meropenem susceptibility were considered for characterizing carbapenem-resistant *Acinetobacter* and *Pseudomonas*. Although there is a phenotypic screening method widely performed (Hodge test), according to the CLSI guidelines, this is only recommended for carbapenem-resistance screening among enterobacteria [31].

According to the literature, colonization and infection by multiresistant bacteria, especially *Pseudomonas* and *Acinetobacter*, is an important and predictive factor for intra-hospital patient death, mainly of immunocompromised individuals [14,34,35]. Our results corroborate data in the literature; high mortality was observed among patients from whom multidrug-resistant *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. were isolated.

The mean age of patients harboring *Acinetobacter* spp. strains was 69.6 years old and the gender distribution was 47.7% female, whereas for patients harboring *Pseudomonas*, the mean age was 77.1 years old and 71.5% were female. Similar age range and gender associated with carbapenem-resistant *Acinetobacter* was previously reported [14] as was a similar patient age range in cases of *Pseudomonas* isolation [35]. Our data may reflect the actual scenario of patients admitted to the evaluated tertiary hospital with high risks of NFGN colonization and infection [34].

Tracheal aspirate was the main clinical specimen associated with multidrug resistant *Acinetobacter* and *Pseudomonas*, followed by catheter, blood, and urine for *Acinetobacter* isolation and urine for *Pseudomonas*. So far, in Brazil, blood and catheter are among the most

frequent clinical specimens associated with carbapenem-resistant NFGN bacteria isolation, followed by respiratory tract secretions, and urine [6,36].

With regards to the antimicrobial susceptibility patterns observed for the isolated carbapenem-resistant NFGN bacteria, a recent study on imipenem-resistant *A. baumannii* in hospital samples pointed to a result similar to that found in our study, i.e., 100% resistance to ciprofloxacin and piperacillin-tazobactam [37]. Data from a national study carried out by others also corroborate these findings [38]. However, these data revealed a high frequency of isolates that were sensitive to tetracycline (approximately 85%), which, however, were different from our results that amounted to 44.4%. As long as therapeutic options for treating multi-resistant *Acinetobacter* spp. strains are quite limited, our results support the effectiveness of polymyxin B and tigecycline [37-39].

Considering *P. aeruginosa*, as the isolation of carbapenem-resistant strains has been growing increasingly in Brazilian hospitals, literature data corroborate our findings, in which resistance was observed against piperacillin-tazobactam, ceftazidime, cefepime, aztreonam and ciprofloxacin, but no resistance was observed against polymyxin B [6,8,34,37]. In this context, our results may support, in regional scale, the reports by the SENTRY program, which pointed out polymyxin B as an alternative drug against multidrug-resistant *P. aeruginosa* [40].

All isolates found in the present study were characterized as *A. baumannii* by using the automatized method Vitek 2 Compact. However, this method is not able to distinguish the *Acinetobacter baumannii* species from the remaining bacteria such as *A. pitii*, *A. nosocomialis*, and *A. calcoaceticus* [17]. Facing methodological limitations, the *Acinetobacter* strains were referred as *Acinetobacter* spp. According to the literature, as long as *bla*_{OXA-51} is an intrinsic gene to *A. baumannii*, its screening would be of interest as an additional tool to confirm the species identification. The *bla*_{OXA-51} is associated with low expression levels, but hyper expression may occur by the insertion of other genetic elements and also be associated with porin permeability alterations and efflux pumps expression [17]. In this study, although we would suggest that *bla*_{OXA-51}⁻ strains are not *A. baumannii*, additional molecular evaluation should be performed to confirm these *Acinetobacter* spp. identification.

The oxacillinase gene *bla*_{OXA-23} has been detected all over the world and has also been pointed out as the predominant carbapenemase among *Acinetobacter* species in some geographic regions, such as, Europe, Australia, Singapore, Americas, Asia, and Africa. This suggests it has already been widely disseminated [41]. In Brazil, *Acinetobacter* strains harboring *bla*_{OXA-23} have been reported in Porto Alegre (RS), Rio de Janeiro and Niterói (RJ), Belo Horizonte (MG) and São Paulo (SP) [14,37,42-45]. In this study the data may support the OXA-23 epidemiology in Brazil, as 61.1% of the *Acinetobacter* strains were *bla*_{OXA-23}⁺.

As observed in other Brazilian hospitals, OXA-143 was also observed in this study. In this country, *bla*_{OXA-143} has been reported in frequencies ranging between 8.4 and 76% [29,46,47]. With regards to OXA-24 and OXA-58, although all *Acinetobacter* strains in this study were *bla*_{OXA-24}⁻ and *bla*_{OXA-58}⁻, international literature suggests these oxacillinases well spread among *A. baumannii* clinical isolates [13-15,28].

In this study, the results may suggest that oxacillinase type carbapenemases were not associated to the *P. aeruginosa* isolates, once no *bla*_{OXA}⁺ strains were observed. According to the literature, in the absence of enzymes with carbapenem hydrolytic activity such as oxacillinases, carbapenem-resistance in NFGN bacteria may be associated to several other mechanisms, which include synthesis of metallo- β -lactamases, increased expression of chromosome-encoded AmpC, reduced outer-membrane porin expression and efflux systems overexpression [48-50].

Conclusion

Despite that empirical chemotherapy is not routinely prescribed to carbapenem-resistant NFGN rods associated infections, regional data is highly important to monitor bacteria epidemiology and infectious spread into hospitals and community. As pointed out above, it is important to enforce a rational use of antimicrobials together with effective practices of microbial and environmental control, including correct identification of bacteria strains that are resistant to several classes of antimicrobials. Although additional methods were not employed to confirm the species identification of *Acinetobacter* isolates, the findings of *bla*_{oxa-51}⁻ strains may suggest that non-*A. baumannii* species are emerging as opportunistic, multi-drug-resistant bacteria, currently resistant to carbapenem drugs in Brazilian hospitals.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Postgraduate Program in Biological Sciences - PGCBIO/UFJF, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq and Fundação Ezequiel Dias (FUNED) for their scientific support.

References

1. Mesaros N, Nordmann P, Plésiat P, Roussel-Delvallez MR, Van Eldere J, Glupczynski Y, Van Laethem Y, Jacobs F, Lebecque P, Malfroot A, Tulkens PM, Van Bambeke F (2007) *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the millennium. Clin Microbiol Infect 13: 560-578.
2. Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA (2007) *Global challenge of multi-drug resistant Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 51: 3471-3484.
3. Paterson DL (2006) The epidemiological profile of infections with multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. Clin Infect Dis 43: Suppl 2 43-48.
4. Furtado GH, Martins ST, Machado AM, Wey SB, Medeiros SA (2006) Clinical culture surveillance of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species in a teaching hospital in São Paulo, Brazil: a 7-year study. Infect Control Hosp Epidemiol 27: 1270-1273.
5. Rice LB (2006) Challenges in identifying new antimicrobial agents effective for treating infections with *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Infect Dis 43: Suppl 2 100–105.
6. Scheffer MC, Bazzo ML, Steindel M, Darini AL, Clímaco E, Dalla-Costa LM (2010) Intra-hospital spread of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a University Hospital in Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop 43: 367-371.
7. Adams-Haduch JM, Paterson DL, Sidjabat HE, Pasculle AW, Potoski BA, Muto CA, Harrison LH, Doi Y (2008) Genetic basis of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates at a tertiary medical center in Pennsylvania. Antimicrob Agents Chemother 52: 3837-3843.
8. Amudhan MS, Sekar U, Kamalanathan A, Balaraman S (2012) *bla*IMP and *bla*VIM mediated carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species in India. J Infect Dev Ctries 6: 757-762.
9. Bonomo RA, Szabo D (2006) Mechanism of multidrug-resistant *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Infect Dis Suppl 2 43: 49-56.

10. Rasmussen JW, Hoiby N (2006) OXA-types carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 57: 373-383.
11. Nordmann P, Poirel L (2002) Emerging carbapenemases in Gram negative aerobes. *Clin Microbiol Infect* 8: 321-331
12. Lu PL, Doumith M, Livermore DM, Chen TP, Woodford N (2009) Diversity of carbapenem resistance mechanisms in *Acinetobacter baumannii* from a Taiwan hospital: spread of plasmid-borne OXA-72 carbapenemase. *J Antimicrob Chemother* 63: 641-647.
13. Morovat T, Bahram F, Mohammad E, Setareh S, Mehdi FM (2009) Distribution of different carbapenem resistant clones of *Acinetobacter baumannii* in Tehran Hospitals. *New Microbiol* 32: 265-271.
14. Perez F, Endimiani A, Ray AJ, Decker BK, Wallace CJ, Hujer KM, Ecker DJ, Adams MD, Toltzis P, Dul MJ, Windau A, Bajaksouzian S, Jacobs MR, Salata RA, Bonomo RA (2010) Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* across a hospital system: impact of post acute care facilities on dissemination. *J Antimicrob Chemother* 65: 1807-1818.
15. Nowak P, Paluchowska P, Budak A (2012) Distribution of *bla*OXA genes among carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* nosocomial strains in Poland. *New Microbiol* 35: 317-325.
16. Poirel L, Nordmann P (2006) Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect* 12: 826-836.
17. Turton JF, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL (2005) Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of *bla*OXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species. *J Clin Microbiol* 44: 2974-2976.
18. Poirel L, Marqué S, Héritier C, Segonds C, Chabanon G, Nordmann P (2005) OXA-58, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 202-208.
19. Peleg AY, Franklin C, Walters LJ, Bell JM, Spelman DW (2006) OXA-58 and IMP-4 Carbapenem-Hydrolyzing β -lactamases in an *Acinetobacter junii* blood culture isolate from Australia. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 399-400.
20. Coelho J, Woodford N, Afzal-Shah M, Livermore D (2006) Occurrence of OXA-58-like carbapenemases in *Acinetobacter* spp. collected over 10 years in three continents. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 756-758.
21. Merkier AK, Catalano M, Ramírez MS, Quiroga C, Orman B, Ratier L, Famiglietti A, Vay C, Di Martino A, Kaufman S, Centrón D (2008) Polyclonal spread of *bla*(OXA-23) and *bla*(OXA-58) in *Acinetobacter baumannii* isolates from Argentina. *J Infect Dev Ctries* 2: 235-240.
22. Liakopoulos A, Miriagou V, Katsifas EA, Karagouni AD, Daikos GL, Tzouvelekis LS, Petinaki E (2012) Identification of OXA-23 producing *Acinetobacter baumannii* in Greece, 2010-2011. *Euro Surveill* 17: 5.
23. Zhang JP, Zhu W, Tian SF, Chu YZ, Chen BY (2010) Molecular characteristics and resistant mechanisms of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in Shenyang, China. *J Microbiol* 48: 689-694.
24. Carretto E, Barbarini D, Dijkshoorn L, van der Reijden TJ, Brisse S, Passet V, Farina C, APSI *Acinetobacter* Study Group (2011) Widespread carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* clones in Italian hospitals revealed by a multicenter study. *Infect Genet Evol* 11: 1319-1326.
25. Poirel L, Naas T, Nordmann P (2010) Diversity, epidemiology and genetics of class D beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 24-38.

26. Higgins PG, Poirel L, Lehmann M, Nordman P, Seifert H (2009) OXA-143, a novel carbapenem-hydrolysing class D β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 5035-5038.
27. Medeiros M, Lincopan N (2013) Oxacillinase (OXA) producing *Acinetobacter baumannii* in Brazil: clinical and environmental impact and therapeutic options. *Braz J Pathol Lab Med* 49: 391-405.
28. Towner KJ, Evans B, Villa B, Levi K, Hamouda A, Amyes SG, Carattoli A (2011) Distribution of intrinsic plasmid replicase genes and their association with carbapenem hydrolysing class D β -lactamase genes in European clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 55: 2154-2159.
29. Mostachio AK, Levin AS, Rizek C, Rossi F, Zerbini J, Costa SF (2012) High prevalence of OXA-143 and alteration of outer membrane proteins in carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. isolates in Brazil. *Int J Antimicrob Agents* 39: 396-401.
30. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2004) Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde. 1ª edição. Available: <http://www.anvisa.gov.br/servicos/audemicrobiologia/introducao.pdf>
31. CLSI (2012) Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 22th information supplement M100-S22, Wayne, PA.
32. Jones RN, Ferraro MJ, Reller B, Schreckenberger PC, Swenson JM, Sader HS (2007) Multicenter studies of tigecycline disk diffusion susceptibility results for *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol* 45: 227-230.
33. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward M, Brown S, Amyes S, Livermore DM (2006) Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents* 27: 351-353.
34. Hammami S, Boutiba-Ben Boubaker I, Ghazzi R, Saidani M, Amine S, Ben-Redjeb S (2011) Nosocomial outbreak of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-2 metallo- β -lactamase in a kidney transplantation unit. *Diag Pathol* 6:106.
35. Peña C, Suarez C, Tubau F, Dominguez A, Sora M, Pujol M, Gudiol F, Ariza J (2009) Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: factors influencing multidrug-resistant acquisition in non-critically ill patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 28: 519-522.
36. Mendes C, Oplustil C, Sakagami E, Turner P, Kiffer C, MYSTIC Brazil Group (2005) Antimicrobial susceptibility in intensive care units: MYSTIC Program Brazil 2002. *Braz J Infect Dis* 9: 44-51.
37. John S, Balagurunathan R (2011) Metallo- β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Indian J Med Microbiol* 29: 302-304.
38. Correa LL, Botelho LA, Barbosa LC, Mattos CS, Carballido JM, Castro CL, Mondino PJ, de Paula GR, de Mondino SS, de Mendonça-Souza CR (2012) Detection of *bla*OXA-23 in *Acinetobacter* spp. isolated from patients of a university hospital. *Braz J Infect Dis* 16: 521-526.
39. Robledo IE, Aquino EE, Santé ML, Santana JL, Otero DM, León CF, Vazquez GJ (2010) Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 1354-1357.
40. Gales AC, Jones RN, Sader HS (2006) Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54,731 clinical isolates of Gram negative bacilli: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2001-2004). *Clin Microbiol Infect* 12: 315-321.
41. Kempf M, Rolain JM (2012) Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. *Int J Antimicrob Agents* 39: 105-114.

42. Carvalho KR, Carvalho-Assef AP, Peirano G, Santos LC, Pereira MJ, Asensi MD (2009) Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying *bla*OXA-23 collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *Int J Antimicrob Agents* 34: 25-28.
43. Martins AF, Kuchenbecker R, Sukiennik T, Boff R, Reiter KC, Lutz L, Machado AB, Barth AL (2009) Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme: dissemination in southern Brazil. *Infection* 37: 474-476.
44. Martins AF, Kuchenbecker RS, Pilger KO, Pagano M, Barth AL, CMCIES-PMPA/SMS Task Force (2012) High endemic levels of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* among hospitals in southern Brazil. *Am J Infect Control* 40: 108-112.
45. Furtado GH, Cavalcante AC, Medeiros EA, Gales AC, Oliveira VG, Girardo R (2011) Bloodstream infections with OXA-23 producing *Acinetobacter baumannii* isolates in a university affiliated hospital in Brazil: epidemiology and clinical outcomes. *Am J Infect Control* 39: 706-708.
46. Werneck JS, Picão RC, Girardello R, Cayô R, Margutti V, Dalla-Costa L, Gales AC, Antonio CS, Neves PR, Medeiros M, Mamizuka EM, Elmor de Araújo MR, Lincopan N (2011) Low prevalence of *bla*OXA-143 in private hospitals in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 55: 4494-4495.
47. Antonio CS, Neves PR, Medeiros M, Mamizuka EM, Elmor de Araújo MR, Lincopan N (2011) High prevalence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the *bla*OXA-143 gene in Brazilian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 55: 1322-1323.
48. Rodriguez-Martínez JM, Poirel L, Nordman P (2009) Molecular Epidemiology and mechanism of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 4783-4788.
49. Tomás M, Doumith M, Warner M, Turton JF, Beceiro A, Bou G, Livermore DM, Woodford N (2010) Efflux pumps, OprD Porin, AmpC β -Lactamase, and multiresistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 2219-2224.
50. Xavier DE, Picão RC, Girardello R, Fehlberg LC, Gales AC (2010) Efflux pumps expression and its association with porin down regulation and β -lactamase production among *Pseudomonas aeruginosa* causing bloodstream infections in Brazil. *BMC Microbiol* 10: 217.

Table 1: Primers used, expected amplicons, and polymerase chain reaction (PCR) conditions.

Target	Primer sequence (5'-3')	Amplicon size (pb)	PCR conditions	References
<i>bla</i> _{OXA-23}	F-5'-GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA-3' R-5'-ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT-3'	501		26
<i>bla</i> _{OXA-24}	F-5'-GGT TAG TTG GCC CCC TTA AA-3' R-5'-AGT TGA GCG AAA AGG GGA TT-3'	246		26
<i>bla</i> _{OXA-51}	F-5'-TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG-3' R-5'-TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG-3'	353	95°C, 5 min; 30x (95°C, 1 min; 52°C, 1 min; 72°C, 1 min); 72°C, 10 min	26
<i>bla</i> _{OXA-58}	F-5'-AAG TAT TGG GGC TTG TGC TG-3' R-5'-CCC CTC TGC GCT CTA CAT AC-3'	599		26
<i>bla</i> _{OXA-143}	F-5'-TGG CAC TTT CAG CAG TTC CT-3' R-5'-TAA TCT TGA GGG GGC CAA CC-3'	149		33

Table 2: Patient's sociodemographic and clinical data related to carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a tertiary hospital between January and December of 2012.

Epidemiological parameters	Carbapenem-resistant bacteria	
	<i>Acinetobacter</i> spp. (n=44)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=28)
Gender (n; %)		
Male	23; 52.3	8; 28.5
Female	21; 47.7	20; 71.5
Age (n; %)		
0-20 years	1; 2.2	0; 0
21-40 years	3; 6.8	2; 7.1
41-60 years	6; 13.6	3; 10.7
> 61 years	34; 77.4	23; 82.1
Clinical specimens (n; %)		
Urine	5; 9.2	13; 31.7
Blood	5; 9.2	2; 4.8
Tracheal secretion	34; 63.2	17; 41.6
Catheter tip	7; 13	6; 14.6
Bronchoalveolar lavage	1; 1.8	0; 0
Ulcer	1; 1.8	2; 4.8
Abdominal secretion	1; 1.8	0; 0
Orthopedic implants	0; 0	1; 2.5
Patient admission unit (n; %)		
Male and female ward	6; 13.6	11; 39.3
Intensive care unit	30; 68.2	12; 42.9
Coronary care unit	7; 16.0	5; 17.8
Neonatal intensive care unit	1; 2.2	0; 0
Patient evolution (n; %)		
Discharged	10; 22.8	6; 21.5
Death	34; 77.2	22; 78.5

Table 3: Antimicrobial susceptibility patterns of the carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* isolated in a tertiary hospital between January and December of 2012.

Antimicrobials	<i>Acinetobacter</i> spp. (n=44)		<i>P. aeruginosa</i> (n=28)	
	R (%)	S (%)	R (%)	S (%)
Imipenem	100.0	0	100.0	0
Meropenem	100.0	0	100.0	0
Ampicillin-sulbactam *	83.4	16.6	-	-
Piperacillin-tazobactam	100.0	0	44.0	56.0
Ceftazidime	100.0	0	100.0	0
Cefepime	100.0	0	100.0	0
Aztreonam *	-	-	90.2	9.8
Amikacin	77.8	22.2	63.4	36.6
Gentamicin	87.1	12.9	19.5	80.5
Tetracycline *	55.6	44.4	-	-
Sulphazotrim *	55.6	44.4	-	-
Ciprofloxacin	100.0	0	90.2	9.8
Tigecycline *	0	100.0	-	-
Polymyxin B	0	100.0	0	100.0

* Antimicrobial drugs not tested against both bacterial species; R: resistance including intermediate resistance; S: sensitivity.

Table 4. Phenotypic and genotypic characteristics of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* recovered from patients in a tertiary hospital between January and December of 2012.

Bacteria	Resistance phenotype	Genotype (<i>bla</i> _{OXA} type genes)	Sampling	
			Unit (n; %)	Months (n)
<i>Acinetobacter</i> spp. (n=44)	MP,IP,TZ,PM,AK,GM,CP,PT,TS	OXA-23	ICU (1; 2.2)	NOV
	MP,IP,TZ,PM,AK,GM,CP,PT,TS,TE	OXA-23	ICU (1; 2.2)	NOV
	MP,IP,TZ,PM,GM,CP,PT,AB,TS,TE	OXA-23	ICU (1; 2.2)	DEC
	MP,IP,TZ,PM,AK,GM,CP,PT,AB,TS,TE	OXA-23	MWAR (1; 2.2)	DEC
	MP,IP,TZ,PM,AK,GM,CP,PT,AB,TS,TE	OXA-51	ICU (1; 2.2)	FEB
	MP,IP,TZ,PM,CP,PT,AB	OXA-23, OXA-51	MWAR (1; 2.2)	APR
	MP,IP,TZ,PM,AK,CP,PT,AB	OXA-23, OXA-51	ICU (1; 2.2)	NOV
	MP,IP,TZ,PM,GM,CP,PT,AB	OXA-23, OXA-51	ICU (1; 2.2)	APR
	MP,IP,TZ,PM,GM,CP,PT,TS	OXA-23, OXA-51	ICU (1; 2.2)	DEC
	MP,IP,TZ,PM,AK,GM,CP,PT,TS	OXA-23, OXA-51	ICU (2; 4.54)	JUN (1) AUG (1)
	MP,IP,TZ,PM,AK,GM,CP,PT,AB	OXA-23, OXA-51	ICU (2; 4.54)	FEB (1) APR (1)
	MP,IP,TZ,PM,AK,CP,PT,AB,TS	OXA-23, OXA-51	CCU (1; 2.2)	MAR
	MP,IP,TZ,PM,CP,PT,AB,TS,TE	OXA-23, OXA-51	CCU (1; 2.2)	JUN
	MP,IP,TZ,PM,CP,PT,AB,TS,TE	OXA-23, OXA-51	MWAR (1; 2.2)	MAR
	MP,IP,TZ,PM,AK,GM,CP,PT,TS,TE	OXA-23, OXA-51	NICU (1; 2.2)	SEP
	MP,IP,TZ,PM,AK,GM,CP,PT,AB,TS	OXA-23, OXA-51	MWAR (1; 2.2)	APR
	MP,IP,TZ,PM,AK,GM,CP,PT,AB,TS	OXA-23, OXA-51	ICU (5; 11.36)	APR (1) MAY (1) JUL (1) SEP (1) OCT (1)

	MP,IP,TZ,PM,AK,GM,CP,PT,AB,TS,TE	OXA-23, OXA-51	CCU (2; 4.54)	MAR (2)
	MP,IP,TZ,PM,CP,PT	OXA-51, OXA-143	ICU (1; 2.2)	DEC
	MP,IP,TZ,PM,CP,PT,AB	OXA-51, OXA-143	CCU (1; 2.2)	OCT
	MP,IP,TZ,PM,AK,CP,PT,AB	OXA-51, OXA-143	ICU (1; 2.2)	OCT
	MP,IP,TZ,PM,AK,GM,CP,PT,AB	OXA-51, OXA-143	FWAR (1; 2.2)	JUL
	MP,IP,TZ,PM,AK,GM,CP,PT,AB	OXA-51, OXA-143	CCU (2; 4.54)	JUL (2)
	MP,IP,TZ,PM,AK,GM,CP,PT,AB	OXA-51, OXA-143	ICU (9; 20.45)	JUL (4) AUG (1) SEP (2) OCT (2)
	MP,IP,TZ,PM,AK,GM,CP,PT,AB,TE	OXA-51, OXA-143	FWAR (1; 2.2)	NOV
	MP,IP,TZ,PM,AK,GM,CP,PT,AB,TS	OXA-51, OXA-143	ICU (1; 2.2)	APR
	MP,IP,TZ,PM,AK,GM,CP,PT,AB,TS,TE	OXA-51, OXA-143	ICU (1; 2.2)	OCT
	MP,IP,TZ,PM,AK,GM, CP, PT, AB	OXA-23, OXA-51, OXA-143	ICU (1; 2.2)	AUG
	MP,IP,TZ,PM,	<i>nd</i> *	ICU (1; 3.57)	MAY
	MP,IP,TZ,PM,AT	<i>nd</i>	FWAR (1; 3.57)	MAY
	MP,IP,TZ,PM,CP,AT	<i>nd</i>	FWAR (1; 3.57)	AUG
	MP,IP,TZ,PM,GM,CP	<i>nd</i>	ICU (1; 3.57)	JUN
	MP,IP,TZ,PM,PT,AT	<i>nd</i>	ICU (1; 3.57)	APR
<i>P. aeruginosa</i> (n=28)	MP,IP,TZ,PM,CP,PT,AT	<i>nd</i>	MWAR (1; 3.57)	SEP
			FWAR (1; 3.57)	OCT
	MP,IP,TZ,PM,AK,GM,CP	<i>nd</i>	FWAR (3; 10.71)	APR (1) MAY (1) AUG (1)
	MP,IP,TZ,PM,AK,GM,CP	<i>nd</i>	ICU (1; 3.57)	APR
	MP,IP,TZ,PM,AK,GM,CP,AT	<i>nd</i>	FWAR (1; 3.57)	FEB
			MWAR (1; 3.57)	OCT

MP,IP,TZ,PM,AK,GM,CP,AT	<i>nd</i>	CCU (3; 10.71)	MAY (1) JUL (2)
MP,IP,TZ,PM,AK,GM,CP,AT	<i>nd</i>	ICU (3; 10.71)	JUL (1) OCT (1) NOV (1)
MP,IP,TZ,PM,AK,GM,CP,PT	<i>nd</i>	ICU (1; 3.57)	JAN
MP,IP,TZ,PM,GM,CP,PT,AT	<i>nd</i>	ICU (2; 7.14)	JAN (1) SEP (1)
MP,IP,TZ,PM,GM,CP,PT,AT	<i>nd</i>	FWAR (2; 7.14)	JUL (1) OCT (1)
MP,IP,TZ,PM,AK,GM,CP,PT,AT	<i>nd</i>	CCU (2; 7.14)	MAY (1) AUG (1)
MP,IP,TZ,PM,AK,GM,CP,PT,AT	<i>nd</i>	ICU (2; 7.14)	JUL (1) OCT (1)

*Oxacillinase type genes (bla_{OXA}) not detected. MP (Meropenem), IP (Imipenem), TZ (Ceftazidime), PM (Cefepime), AK (Amikacin), GM (Gentamicin), CP (Ciprofloxacin), PT (Piperacillin-Tazobactam), AB (Ampicillin-Sulbactam), TE (Tetracycline), TS (Trimethoprim-Sulfamethoxazole), AT (Aztreonam), FWAR (Female Ward), MWAR (Male Ward), ICU (Intensive Care Unit), CCI (Coronary Care Unit), NICU (Neonatal Intensive Care Unit). JAN: January; FEB: February; MAR: March; APR: April; JUN: June; JUL: July; AUG: August; SEP: September; OCT: October; NOV: November; DEC: December

11.2 ARTIGO 2



Physiological and molecular characteristics of carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter aerogenes* with involvement in bacterial virulence

Rito Santo Pereira^a, Vanessa Cordeiro Dias^{a,b}, Alessandra Barbosa Ferreira-Machado^a, Juliana Alves Resende^a, André Netto Bastos^b, Lucas Quinet de Andrade Bastos^b, Victor Quinet de Andrade Bastos^b, Ricardo Villela Bastos^b, Vânia Lúcia da Silva^a, Cláudio Galuppo Diniz^{a,*}

^a*Department of Parasitology, Microbiology and Immunology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, 36036-900, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil;*

^b*Cortes Villela Clinical Laboratory, 36016-904, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil.*

Aceito em 07/02/2015

Outras atividades realizadas durante o período:

1. Apresentação de trabalho no Seminário de Iniciação Científica da Universidade Federal de Juiz de Fora: **Avaliação de marcadores de resistência a antimicrobianos em linhagens de *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos.** Juiz de Fora, MG, dezembro de 2015.
2. Apresentação de trabalho no Seminário de Iniciação Científica da Universidade Federal de Juiz de Fora: **Aspectos fisiológicos e moleculares da virulência e resistência aos carbapenêmicos em *Klebsiella* e *Enterobacter*, isoladas em um hospital terciário.** Juiz de Fora, MG, dezembro de 2015.
3. Apresentação de trabalho no 28º Congresso Brasileiro de Microbiologia: **Carbapenem resistance and virulence characteristics in *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a tertiary hospital.** Florianópolis, SC, outubro de 2015.
4. Participação em banca examinadora do Trabalho de Conclusão de Curso da acadêmica do curso de Farmácia ALINE AUGUSTA SAMPAIO FERNANDES, INTITULADO: **Pesquisa de marcadores genéticos de resistência em amostras de *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos.** Julho de 2015.
5. Participação na co-orientação do estudante de mestrado RITO SANTO PEREIRA, intitulado: **Aspectos fisiológicos e moleculares da resistência aos carbapenêmicos em *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter aerogenes*, com implicação na virulência bacteriana.** Novembro de 2014.
6. Apresentação de trabalho no Seminário de Iniciação Científica da Universidade Federal de Juiz de Fora: **Aspectos fisiológicos e moleculares da virulência e resistência aos carbapenêmicos em bastonetes Gram negativos, isolados em um hospital terciário.** Juiz de Fora, MG, outubro de 2014.
7. Apresentação de trabalho no 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia: **Avaliação fenotípica e genotípica da produção de carbapenemases em enterobactérias isoladas de um hospital terciário.** Natal, RN, outubro de 2013.